



ISEL

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA

ÁREA DEPARTAMENTAL DE ENGENHARIA QUÍMICA

**CONTRIBUTO PARA A AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DE
CAROTENOIDES PELA POPULAÇÃO PORTUGUESA COM
BASE NA SUA DETERMINAÇÃO ANALÍTICA EM AMOSTRAS
REPRESENTATIVAS - EFEITO DA SAZONALIDADE**

LUCÉLIA NETO DA SILVA

(Licenciada em Engenharia Química e Biológica)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre
em Engenharia Química e Biológica

Orientadores:

Doutora Maria Celeste Serra

Doutora Maria da Graça S. Bento M. Leitão Dias

Júri:

Presidente: Prof^ª Doutora Rita Pacheco

Vogais:

Doutora Elsa Vasco

Doutora M. Graça Dias

Dezembro 2016



ISEL

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA

ÁREA DEPARTAMENTAL DE ENGENHARIA QUÍMICA

**CONTRIBUTO PARA A AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DE
CAROTENOIDES PELA POPULAÇÃO PORTUGUESA COM
BASE NA SUA DETERMINAÇÃO ANALÍTICA EM AMOSTRAS
REPRESENTATIVAS - EFEITO DA SAZONALIDADE**

LUCÉLIA NETO DA SILVA

(Licenciada em Engenharia Química e Biológica)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre
em Engenharia Química e Biológica

Orientadores:

Doutora Maria Celeste Serra

Doutora Maria da Graça S. Bento M. Leitão Dias

Júri:

Presidente: Prof^ª Doutora Rita Pacheco

Vogais:

Doutora Elsa Vasco

Doutora M. Graça Dias

Dezembro 2016

O trabalho apresentado nesta dissertação foi realizado no âmbito do 2º Ciclo em Engenharia Química e Biológica- ramo de Processos Químicos do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, no Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP sob orientação da Doutora Maria da Graça Dias e da Professora Doutora Maria Celeste Serra.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge pelo financiamento e pela oportunidade de estágio.

A todas as pessoas que fazem parte do DAN, por toda a atenção recebida e pela simpatia demonstrada, especialmente pela Doutora Maria Antónia Calhau.

As minhas orientadoras, Doutora Maria da Graça Dias e Doutora Maria Celeste Serra, por todo o apoio demonstrado, atenção, simpatia, amizade, disponibilidade durante todo o período da tese.

As minhas colegas de laboratório, Mafalda Silva, Denise Costa, por todos os conselhos, carinho, atenção demonstrados principalmente nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos, Jerson e Daniela que me acompanharam nesse percurso académico, por todo o apoio, carinho, amizade e paciência demonstrada.

E por último, mas não menos importante, aos meus familiares, principalmente aos meus pais, pelo apoio e amor incondicional, por acreditarem em mim e por me incentivarem a continuar com essa jornada sem nunca desistir.

Resumo

Com este trabalho determinou-se o teor de carotenoides (α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, luteína e zeaxantina) em amostras compostas recolhidas no âmbito do projeto TDSExposure (Estudo de Dieta Total), principalmente em frutos e produtos hortícolas.

Avaliou-se e comparou-se o teor de carotenoides em amostras de alimentos recolhidos em diferentes estações do ano, utilizando o método analítico que se encontra acreditado no laboratório de Química do INSA pela norma ISO EN 17025 para a determinação de carotenoides em frutos e produtos hortícolas. O processo de tratamento das amostras incluiu passos de extração e saponificação. A análise dos carotenoides foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência em fase invertida, com deteção no UV/Visível a um comprimento de onda de 473 nm para o licopeno e 450 nm para os restantes carotenoides.

As análises ao material de referência interno permitiram confirmar que o método analítico nas condições utilizadas teve um desempenho adequado.

Para a comparação dos teores de carotenoides ao longo do ano utilizou-se a Diferença Mínima Significativa (DMS), calculada a partir da incerteza expandida do resultado da medição para um nível de significância de 5%.

Os resultados analíticos evidenciaram para algumas matrizes/carotenoides um efeito sazonal (salada de frutas, laranja, figo seco, melão, meloa, maçã, pera, uva, tomate, alface, pimento e feijão-verde, cenoura, nabijas e batata), mas para outras isso não aconteceu (brócolos, grelos e couve-flor).

Os resultados sobre o efeito da sazonalidade no teor de carotenoides nos frutos mostraram para o β -caroteno uma maior gama de variação ao longo do ano (0,0041-0,38 mg/100 g). Nos produtos hortícolas, ao comparar os resultados obtidos na primavera e verão, o teor de β -caroteno foi também o mais influenciado pelo efeito da sazonalidade (0,0035-8,2 mg/100 g).

Palavras-chave: Sazonalidade, carotenoides, HPLC, frutos, produtos hortícolas

Abstract

Carotenoids (α -carotene, β -carotene, β -cryptoxanthin, lycopene, lutein and zeaxanthin) were determined in composite samples collected under the TDSExposure (Total Diet Study Exposure) project, mainly on fruits and products vegetables.

The carotenoid content was evaluated and compared in food samples collected in different seasons of the year, using the analytical method that is accredited in the Chemistry Laboratory of INSA by ISO EN 17025 for the determination of carotenoids in fruits and products vegetables. The sample treatment process included extraction and saponification steps. Carotenoid analysis was performed by reversed phase high performance liquid chromatography with UV / Visible detection at a wavelength of 473 nm for lycopene and 450 nm for the remaining carotenoids.

The analyzes of the internal reference material allowed to confirm that the analytical method under the conditions used had an adequate performance.

For the comparison of carotenoid contents throughout the year, the Significant Minimum Difference (DMS) was calculated from the expanded uncertainty of the measurement result at a significance level of 5%.

The analytical results showed for some matrices / carotenoids a seasonal effect (fruit salad, orange, dried fig, melon, cantaloupe, apple, pear, grape, tomato, lettuce, peppers and green beans, carrots, turnips and potatoes), but for others this did not happen (broccoli, greens and cauliflower).

The results on the effect of seasonality on the carotenoid content in the fruits showed a higher variation range for β -carotene throughout the year (0,0041-0,38 mg / 100 g). In vegetables, when comparing spring and summer results, β -carotene content was also most influenced by the effect of seasonality (0,0035-8,2 mg / 100 g).

Keywords: carotenoids, fruits, vegetable seasonal, HPLC

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo	iii
Abstract.....	v
Índice	ix
Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas	xiii
Lista de Abreviaturas.....	xv
1. Objetivos do Trabalho.....	1
2. Enquadramento do Tema	3
3. Introdução	5
3.1. Estrutura e características dos carotenoides.....	6
3.2. Fontes naturais dos principais carotenoides	9
3.3. Biodisponibilidade e bioacessibilidade dos carotenoides.....	10
3.4. Importância dos carotenoides para a saúde.....	12
3.4.1. Funções biológicas.....	12
3.4.2. Prevenção de doenças.....	14
3.5. Fatores que influenciam a composição em carotenoides dos alimentos.....	16
3.5.1. Estação do Ano	16
3.5.2. Outros fatores	17
3.6. Métodos analíticos para a determinação de carotenoides	20
3.6.1. Métodos de extração e saponificação.....	21
3.6.1.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	22
3.6.1.2. Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência	25
3.6.1.3. Outras técnicas de análise	26
3.7. Material de Referência Interno.....	27
3.8. Parâmetros Estatísticos	28
4. Materiais e Métodos.....	31
4.1. Reagentes	31
4.2. Padrões	32
4.3. Equipamento	32
4.4. Soluções.....	33
4.4.1. Soluções de trabalho.....	33
4.4.2. Fase móvel para HPLC	34
4.4.3. Soluções de padrões internos.....	35
4.4.4. Soluções de padrões externos.....	35

4.5.	Procedimento experimental	37
4.5.1.	Identificação das amostras.....	37
4.5.2.	Extração.....	38
4.5.3.	Saponificação	39
4.5.4.	Condições cromatográficas	39
4.5.5.	Identificação dos analitos	40
4.5.6.	Quantificação dos analitos	41
4.6.	Utilização do material de referência interno	42
4.7.	Diferença Mínima Significativa (DMS)	42
5.	Resultados e Discussão	45
5.1.	Análise do Material de referência interno	46
5.1.1.	Carta de Controlo de médias	46
5.2.	Carotenoides em amostras de frutos avaliados sob o ponto de vista da sazonalidade.....	50
5.2.1.	Influência da sazonalidade	50
5.2.2.	Comparação com os resultados da literatura	60
5.3.	Carotenoides em produtos hortícolas - influência da sazonalidade.....	63
5.3.1.	Influência da sazonalidade	63
5.3.2.	Comparação com os resultados da literatura	73
5.4.	Carotenoides em amostras não avaliadas sob o ponto de vista da sazonalidade	77
5.4.1.	Frutos.....	77
5.4.2.	Cogumelos e leguminosas	80
5.4.3.	Produtos processados contendo frutos.....	82
6.	Conclusões	83
7.	Proposta de trabalho futuro	87
8.	Referências Bibliográficas	89
	ANEXOS.....	103
	Anexo 1.....	104
	Anexo 2.....	109
	Anexo 3.....	110
	Anexo 4.....	115
	Anexo 5.....	116
	Anexo 6.....	124
	Anexo 7.....	125
	Anexo 8.....	126
	Anexo 9.....	127
	Anexo 10.....	128

Índice de Figuras

Figura 3.1- Estrutura química dos principais carotenoides presente nos alimentos e no plasma humano (adaptado de http://en.citizendium.org/wiki/Lycopene).....	7
Figura 3.2 – Sistema de análise por HPLC (Adaptado de Bhardwaj et al., 2015).	23
Figura 5.1- Cromatograma da amostra de salada de frutas contendo 1 - luteína (tr=5,019 min), 2 - zeaxantina (tr=5,340 min), 3 – β -criptoxantina (tr=8,426 min), 4 – equinenona (tr=8,836 min), 5 - licopeno (tr=12,110 min), 6 – α -caroteno (tr=15,310 min) e 7- β -caroteno (tr=16,783 min).	45
Figura 5.2- Carta de controlo de médias para o α -caroteno.....	47
Figura 5.3 - Carta de controlo de médias para o β -caroteno.....	47
Figura 5.4 - Carta de controlo de médias para o licopeno.....	48
Figura 5.5 - Carta de controlo de médias para a luteína.	48
Figura 5.6 – Carta de controlo de médias para a zeaxantina.....	49
Figura 5.7- Carta de controlo de médias para a β -criptoxantina.	49
Figura 5.8- Teor de carotenoides nas amostras de salada de frutas nas quatro estações do ano.....	53
Figura 5.9- Teor de carotenoides em uvas nas quatro estações do ano.	53
Figura 5.10- Teor de carotenoides em laranjas nas quatro estações do ano.	54
Figura 5.11- Teor de carotenoides em maçãs nas quatro estações do ano.	55
Figura 5.12- Teor de carotenoides em pêras nas quatro estações do ano.....	56
Figura 5.13- Teor de carotenoides em figos secos nas quatro estações do ano.	57
Figura 5.14- Teor de carotenoides em meloa em duas estações do ano.	58
Figura 5.15- Teor de carotenoides em amostras de melão em duas estações do ano.	58
Figura 5.16- Teor de carotenoides em amostras de batatas nas quatro estações do ano.	65
Figura 5.17- Teor de carotenoides em amostras de brócolos em duas estações do ano.	66
Figura 5.18- Teor de carotenoides em amostras de tomate em duas estações do ano.	67
Figura 5.19- Teor de carotenoides em amostras de alface em duas estações do ano.	67
Figura 5.20- Teor de carotenoides em amostras de grelos em duas estações do ano.	68
Figura 5.21- Teor de carotenoides em nabiças em duas estações do ano.	69
Figura 5.22- Teor de carotenoides em cenouras em duas estações do ano.	69
Figura 5.23- Teor de carotenoides em couve-flor nas duas estações do ano.	70
Figura 5.24- Teor de carotenoides em pimentos nas duas estações do ano.	71
Figura 5.25- Teor de carotenoides em feijão-verde nas duas estações do ano.	71
Figura 5.26- Teor de carotenoides nos frutos analisadas.	79
Figura 5.27- Teor de carotenoides nas amostras de cogumelos, feijão e feijão frade.	80
Figura 5.28- Teor de carotenoides nas passas de uvas e tarte de frutas.	82

Índice de Tabelas

Tabela 4.1-Coeficientes de extinção (ϵ) e comprimentos de onda de absorção máxima (λ) dos carotenoides (DAN, 2012).	36
Tabela 4.2-Soluções padrão de trabalho.	37
Tabela 4.3-Condições cromatográficas utilizadas na análise por HPLC.	40
Tabela 4.4-Condições aplicadas no modo de eluição em gradiente.....	40
Tabela 5.1- Teores dos carotenoides nas amostras do MR interno (mg/100 g).	46
Tabela 5.2- Teores de carotenoides nas amostras de frutos analisadas para o estudo do efeito da sazonalidade	51
Tabela 5.3-Época ideal, em termos de ingestão de carotenoides e época recomendada para o consumo de frutos em Portugal.	59
Tabela 5.4-Comparação do teor em carotenoides (mg/100 g) obtido neste trabalho com os resultados da literatura.	61
Tabela 5.5- Teores dos carotenoides nas amostras de produtos hortícolas-sazonalidade.	64
Tabela 5.6-Época ideal, em termos de ingestão de carotenoides e época para o consumo de produtos hortícolas em Portugal.	73
Tabela 5.7-Comparação do teor em carotenoides (mg/100 g) obtido neste trabalho com os resultados da literatura.	74
Tabela 5.8- Teores dos carotenoides presentes nas amostras de frutos analisadas (mg/100 g).....	78
Tabela 5.9- Teores dos carotenoides nas amostras de cogumelos, feijão e feijão-verde (mg/100 g).	80
Tabela 5.10- Teores dos carotenoides nas amostras de cogumelos, feijão frade e feijão.	81
Tabela 5.11- Teores dos carotenoides nas amostras de passas de uvas e tarte de frutas (mg/100 g).	82

Lista de Abreviaturas

ACN- Acetonitrilo
ADN - Ácido desoxirribonucleico
ASE - Extração Acelerada de Solvente
BHT – Hidroxitolueno Butilado
CO₂ - Dióxido de Carbono
CQ - Controlo da Qualidade
DAD – Detetor de Rede de Díodos (*Diode Array Detector*)
DAN – Departamento de Alimentação e Nutrição
DCM – Diclorometano
DDR – Dose Diária Recomendada
DMRI – Degeneração Macular relacionada com a Idade
DMS – Diferença Mínima Significativa
EAU -Extração Assistida por Ultra-sons
ECD - Detetores Eletroquímicos
EtOH – Etanol
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPLC-DAD - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detetor de rede de díodos
INSA – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP
IPAC – Instituto Português da Acreditação
KOH – Hidróxido de Potássio
LDL – Lipoproteínas de Baixa Densidade
MAE - Extração Assistida por Micro-ondas
MeOH- Metanol
MR – Material de Referência
MRC – Material de Referência Certificado
MRI - Material de Referência Interno
MS – Espetrometria de Massa
ms – Matéria Seca
NIST - *National Institute of Standards Technology*
NP-HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de fase normal
PLE - Extração Líquida Pressurizada
R- Recuperação do padrão interno
RMN - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
ROS – Espécies Reativas de Oxigénio (*Reactive Oxygen Species*)

RP-HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de fase inversa

SFC- Cromatografia do Fluido Supercrítico

SFE- Extração com Fluido Supercrítico

TDSExposure – Estudo de Dieta Total (*Total Diet Study Exposure*)

TEA- Trietilamina

THF- Tetrahidrofurano

tr – Tempo de Retenção

UHPLC – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

UV/Vis – Ultravioleta/ Visível

1. Objetivos do Trabalho

O presente trabalho teve os seguintes objetivos:

- ✓ Análise de alimentos para determinação do teor de carotenoides: frutos (laranja, pêssago, banana, ananas, uvas, kiwi, salada de frutas, maçã, pera, figos, meloa, melão), produtos hortícolas (batata, brócolos, tomate, alface, grelos, nabiças, cenouras, couve-flor, pimentos, feijão verde, cogumelos), passas de uvas, tartes de frutas com frutos secos, feijão-frade e outras variedades de feijão. Contribuição para avaliar a ingestão de carotenoides pela população portuguesa.
- ✓ Avaliação e comparação do teor de carotenoides em amostras de frutos e produtos hortícolas – recolhidas em diferentes estações do ano com vista à avaliação do efeito da sazonalidade.

2. Enquadramento do Tema

Os carotenoides são compostos bioativos que foram descobertos no século XIX e que atualmente são de grande importância para a saúde humana. Há bem pouco tempo, o interesse nesses compostos estava relacionado com a atividade de provitamina A que alguns carotenoides apresentam. O combate às carências nutricionais, principalmente à deficiência em vitamina A, continua a ser um dos problemas que mais afeta principalmente crianças de países em desenvolvimento, provocando altos índices de doença e consequentemente de mortalidade. Atualmente, está bem definido que dietas ricas em carotenoides apresentam inúmeros benefícios para a saúde humana independentemente da sua atividade de pró-vitamina A. A ingestão de alimentos que contêm carotenoides na alimentação humana previne e minimiza o desenvolvimento de algumas doenças, tais como, cataratas, doenças cardiovasculares e cancro.

Apesar de desempenharem um papel fundamental na saúde humana, os carotenoides não são considerados como “nutrientes” essenciais. Dados os benefícios para a saúde humana, bem como o facto da composição em carotenoides variar de alimento para alimento, e para uma mesma espécie de produto, com o clima, a variedade, o meio de cultivo, a sazonalidade, localização geográfica, processamento e armazenamento, fazem com que a sua determinação seja de grande importância nomeadamente para a introdução em tabelas da composição de alimentos.

As considerações relativamente à composição em carotenoide bem como aos fatores que influenciam a composição em carotenoides dos alimentos são de grande interesse não apenas para produtores e consumidores, mas também em termos de investigação, nomeadamente do projeto TDSExposure, no âmbito do qual se realizou este trabalho. Este é um projeto financiado pela União Europeia cujo objetivo é harmonizar metodologias para avaliar a exposição a nutrientes e a contaminantes.

3. Introdução

Os carotenoides são moléculas lipofílicas naturais com diversas estruturas e funções, sintetizados por plantas e também por alguns fungos e bactérias. Representam um grupo de mais de 700 pigmentos naturais cujas cores variam entre o vermelho e o amarelo (Dias et al., 2009). São dos pigmentos naturais mais estudados em termos de estrutura, composição, propriedades, estabilidade/instabilidade, cinética, metabolismo, biossíntese, benefícios para a saúde, aditivos alimentares (Rodriguez-Amaya, 1997; Rodriguez-Amaya et al., 2006). Como aditivos alimentares, são usados na indústria alimentar o β -caroteno-E160a, licopeno-E160d e a luteína-E161b, segundo a legislação em vigor (Decreto-Lei 193/2000 de 18 de agosto).

Nas plantas, os carotenoides localizam-se normalmente nos cromoplastos e estão presentes nas sementes, raízes, folhas, frutos, flores (Howitt e Pogson, 2006; Mellado-Ortega e Hornero-Méndez, 2015). Apesar de existirem principalmente nas plantas, também podem ser encontrados em animais e microrganismos (Oliver e Palou, 2000, 2000). Para os animais, a fonte de carotenoides encontra-se nos frutos e vegetais usados na sua alimentação (Amorim-Carrilho et al., 2014; Quirós e Costa, 2006; Rodriguez-Amaya et al., 2006). Os principais carotenoides existentes nos alimentos e no plasma humano são seis: α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, luteína e zeaxantina (Amorim-Carrilho et al., 2014; Barba et al., 2006).

Nos países em desenvolvimento, 80 a 90% da ingestão de vitamina A é obtida a partir do consumo dos carotenoides dos frutos e legumes (Maiani et al., 2009). Dos mais de 700 pigmentos naturais identificados até ao momento, apenas 50 apresentam atividade de pró-vitamina A como é o caso do α -caroteno, β -caroteno e β -criptoxantina (Amorim-Carrilho et al., 2014). Atualmente, um grande número de estudos epidemiológicos revela que, independentemente da atividade de provitamina A, a ingestão de alimentos contendo carotenoides apresenta inúmeros benefícios para a saúde (Rodriguez-Amaya, 2010; Oliver e Palou, 2000).

O consumo de alimentos contendo carotenoides reduz o risco de desenvolvimento de muitas doenças tais como: cancro, doenças cardiovasculares, cataratas, degeneração macular e doenças degenerativas (Amorim-Carrilho et al., 2014; Barba et al., 2006). Apesar de terem um papel muito importante na saúde, os carotenoides não têm atribuído um valor de dose diária recomendada (DDR) (Rao e Rao, 2007).

A composição em carotenoides dos alimentos pode variar quantitativa e/ou qualitativamente. Para uma mesma espécie, estas variações ocorrem por diversos fatores

sendo a sazonalidade um dos fatores que mais influencia a composição de carotenoides nos alimentos (Maiani et al., 2009; Rodriguez-Amaya et al., 2006).

3.1. Estrutura e características dos carotenoides

Os carotenoides presentes na natureza apresentam uma estrutura formada a partir de unidades isoprenóides, uma longa cadeia de ligações duplas conjugadas localizada no centro da molécula e simetria bilateral. Estas características justificam as propriedades físicas e químicas destes compostos que estão diretamente relacionadas com a sua estrutura. A geometria da molécula (tamanho, configuração, presença de grupos funcionais), o sistema de ligações duplas conjugadas e as interações específicas com outras moléculas vizinhas são fatores cruciais que influenciam as propriedades e as características dos carotenoides (Britton, 1995; Rao e Rao, 2007; Stahl e Sies, 2003; Young e Frank, 1996).

Estrutura química

Os carotenoides são tetraterpenóides C₄₀ e são formados a partir de oito unidades isoprenóides C₅ que se encontram ligadas de forma que a sua sequência fica invertida no centro dando origem a uma molécula simétrica. A Figura 3.1 apresenta a estrutura química dos principais carotenoides presentes nos alimentos (Britton, 1995; Rodriguez-Amaya, 1997; Rodriguez-Amaya, 2001).

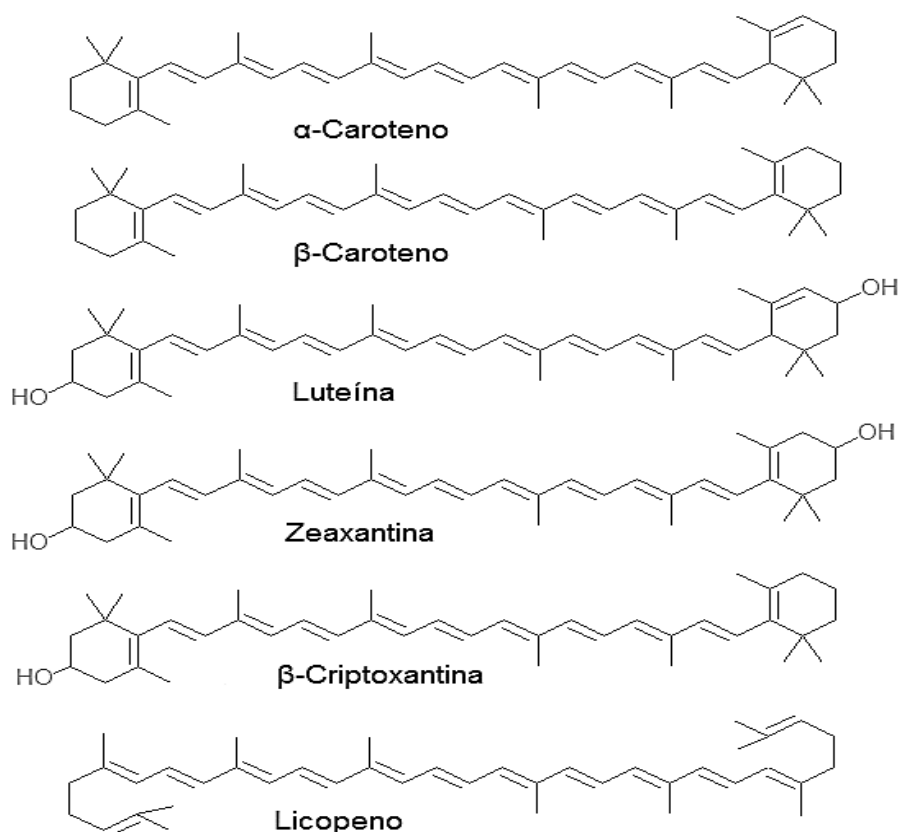


Figura 3.1 - Estrutura química dos principais carotenoides presente nos alimentos e no plasma humano (adaptado de <http://en.citizendium.org/wiki/Lycopene>).

Devido às ligações duplas os carotenoides podem existir em duas formas (configurações) que são designadas por *cis* ou *trans*. Na natureza os carotenoides existem na forma *all-trans* (*all-E*) que é a forma mais estável. A presença de uma ligação *cis* resulta num maior impedimento estereoquímico junto dos átomos de hidrogénio e/ou grupos metilo. Por esta razão os isómeros *cis* são termodinamicamente menos estáveis. Só em algumas situações por ação de agentes específicos ocorre a isomerização ou oxidação geométrica dos carotenoides que se encontram na forma mais estável para a configuração *cis* (Britton, 1995; Rodriguez-Amaya, 1997; Rodriguez-Amaya, 2001; Meléndez-Martínez et al., 2010; Meléndez-Martínez et al., 2007).

Estruturalmente, os carotenoides podem ser classificados em dois grupos:

- **Carotenos**: (ex. α-caroteno, β-caroteno e licopeno) – são altamente apolares, formados apenas por carbono e hidrogénio.

- Xantofilas: (ex. β -criptoxantina, luteína e zeaxantina) – são compostos polares, formados por carbono, hidrogénio e oxigénio (Augustynska et al., 2015; Courraud et al., 2013; Hempel et al., 2016; Sajilata et al., 2008).

Este último grupo é o mais complexo e pode ser encontrado na forma livre (tal como os carotenos) ou na forma de ácidos gordos esterificados (Murillo et al., 2013).

Os carotenoides apresentam nas suas extremidades grupos lineares ou cíclicos como por exemplo o ciclo-hexano e o ciclo-pentano o que permite assumir várias estruturas pela adição de átomos de oxigénio. A hidrogenação, a ciclização e outras modificações como a isomerização, introdução de grupos funcionais contendo oxigénio ou mesmo a combinação desses processos pode resultar numa grande variedade de estruturas para os carotenoides (Rodriguez-Amaya, 2001).

Principais características

Uma das principais características dos carotenoides é a capacidade de apresentarem uma grande variedade de cores que vão desde o amarelo até ao vermelho como consequência da existência do sistema de ligações duplas conjugadas. Este sistema constitui o cromóforo que permite a obtenção de um espectro de absorção na região do UV/Visível característico dos carotenoides e muito importante para a sua identificação e quantificação. Os carotenoides só apresentam cor quando a molécula tem várias ligações duplas conjugadas. Nessas situações o seu comprimento de onda de máxima absorção desloca-se para a região do visível do espectro (400-600 nm). São precisas no mínimo 7 ligações duplas conjugadas para que a molécula apresente cor. Quando tal não acontece os comprimentos de onda de máxima absorção estarão na região do ultravioleta pelo que não serão compostos corados, como é o caso do fitoeno e do fitoflueno que apresentam 3 e 5 ligações duplas conjugadas, respectivamente (Britton, 1995; Meléndez-Martínez et al., 2007; Meléndez-Martínez et al., 2010; Rodriguez-Amaya, 2001).

A existência do sistema de ligações duplas conjugadas também é responsável pela instabilidade dos carotenoides provocando a predisposição para a ocorrência de reações de isomerização geométrica e oxidação. Os agentes que promovem a oxidação são a luz, o calor, metais, enzimas e oxigénio. No caso da isomerização os agentes responsáveis são o calor, a radiação e os ácidos. Como consequência, estes dois mecanismos provocam a perda de cor presente nos alimentos. Para minimizar as condições necessárias de ocorrência destes dois mecanismos devem ser tomadas algumas medidas de precaução aquando da preparação, armazenamento e processamento

industrial dos alimentos (Meléndez-Martínez et al., 2007; Rao e Rao, 2007; Rodriguez-Amaya, 2001).

3.2. Fontes naturais dos principais carotenoides

Os principais carotenoides estão presentes em alimentos como cenouras, abóboras, batata-doce, tomate e óleos vegetais (óleo de palma e seus derivados). A maior parte das xantofilas são encontradas em vegetais verdes e folhosos e quase todos os carotenoides são encontrados em vegetais amarelos (Zeb e Mehmood, 2004).

Na alimentação humana, os carotenoides encontram-se em diversos alimentos, mas os sumos, as frutas e os produtos hortícolas são as suas principais fontes (Rao e Rao, 2007). A Tabela 3.1 apresenta os alimentos que são fontes naturais dos principais carotenoides.

Tabela 3.1- Fontes naturais dos principais carotenoides (Burri et al., 2016; Amorim-Carrilho et al., 2014; Courraud et al., 2013; Fish, 2012; Tanaka et al., 2012; Rodriguez-Amaya et al., 2006; Zeb e Mehmood, 2004; Paiva e Russell, 1999; Sajilata et al., 2008; Parada et al., 2007).

Carotenoides	Fontes naturais
α -caroteno	Couve-galega, nabo, espinafre, alface, manga, meloa, melão, pimenta, abóbora, cenoura, batata-doce, brócolos, feijão-verde, óleo de palma
β -caroteno	Cenoura, batata-doce, abóbora, brócolos, feijão-verde, espinafre, melão, manga, damasco, pimenta, couve, óleo de palma, nêspera, couve-de-bruxelas, kiwi, alface
β -criptoxantina	Mandarina, mamão, milho, ervilhas, gema de ovo, pitanga, pera, caqui, ameixas, abobora, laranja, pêssego, tangerina
Licopeno	Tomate, melancia, goiaba, toranja vermelha, azeitona, pêssego, papaia, pitanga, damasco
Luteína	Espinafre, couve-galega, couve-de-bruxelas, milho, diospiro, brócolos, gema de ovo, pimenta vermelha, repolho, pêssego, ameixas, abobora, feijão-verde, brócolos, kiwi, alface, ervilhas
Zeaxantina	Espinafre, couve-galega, couve, milho, diospiro, brócolos, gema de ovo, pêssego, ameixas, abobora, feijão-verde, brócolos, kiwi, alface, ervilhas, repolho, manga

De uma forma geral, as frutas cor de laranja são ricas em β -criptoxantina, os legumes de cor verde escura em luteína, o tomate em licopeno e a gema de ovo em zeaxantina (Rao e Rao, 2007; Zeb e Mehmood, 2004; Rodriguez-Amaya, 2001; Tanaka et al., 2012).

O β -caroteno é o carotenoide predominante nos alimentos, principalmente nos frutos e vegetais, umas vezes em maior e outras vezes em menor concentração. Em alguns alimentos encontra-se acompanhado de α -caroteno normalmente em menor concentração. Na cenoura, é o principal carotenoide.

O licopeno é o principal carotenoide presente em muitos frutos de cor vermelha, mas a sua principal fonte provém do tomate e os seus derivados. Eles constituem cerca de 85% do total de licopeno consumido e podem ser encontrados em pratos como chili com carne e pizza. O *ketchup*, por exemplo, é também um dos grandes contribuidores para a ingestão de licopeno na alimentação (Krinsky e Johnson, 2005; Johnson, 2002; Rodriguez-Amaya et al., 2006; Gerster, 1997; Rodriguez-Amaya, 2001; Zeb e Mehmood, 2004).

A luteína é o carotenoide mais abundante/predominante nas folhas, vegetais verdes e flores amarelas (Rodriguez-Amaya, 2001). Apesar da luteína e da zeaxantina serem derivados do β -caroteno, a luteína é mais predominante nos alimentos do que a zeaxantina. Legumes de cor verde escura são uma fonte rica em luteína, seguida de β -caroteno. Na alface a concentração da luteína é ligeiramente maior ou mesmo igual à do β -caroteno (Rodriguez-Amaya et al., 2006). Os dois alimentos deste grupo que apresentam maior concentração de luteína e zeaxantina são o espinafre e a couve. Outras fontes incluem brócolos, ervilhas, couves de bruxelas, gema de ovo (Krinsky e Johnson, 2005; Johnson, 2002).

No entanto, a composição de carotenoides nos frutos e produtos hortícolas varia de acordo com a variedade da planta, grau de maturação, tempo de colheita, condições de armazenamento e processamento (Paiva e Russell, 1999).

3.3. Biodisponibilidade e bioacessibilidade dos carotenoides

Os carotenoides quando atingem o seu local de ação no organismo humano, passam a ser biologicamente ativos, apresentado inúmeros benefícios para a saúde (Rodriguez-Amaya, 2015). É neste contexto que a biodisponibilidade e a bioacessibilidade são conceitos importantes que devem ser avaliados.

A biodisponibilidade é descrita como a fração da quantidade de carotenoides ingerida pelo organismo humano, que se encontra livre para funções biológicas ou armazenamento. A bioacessibilidade refere-se à fração dos carotenoides ingeridos que, durante o processo de digestão, é libertada a partir da matriz alimentar, tornando-se dessa forma acessível para absorção intestinal (Rodriguez-Amaya, 2015; Rodriguez-Amaya et al., 2006; O'Connell et al., 2007; Fernández-García et al., 2012; Lemmens et al., 2014).

A biodisponibilidade de carotenoides é influenciada por diversos fatores, entre os quais se destacam a natureza da matriz alimentar, tipo, estrutura e quantidade de carotenoide, interação com outros carotenoides, presença de outros componentes na dieta (fibra, gordura), método de processamento (Rodriguez-Amaya, 2016; Rodriguez-Amaya, 2015; Rodriguez-Amaya et al., 2006; Reboul et al., 2006; O'Connell et al., 2007; Stinco et al., 2012; Verrijssen et al., 2014; Thakkar e Failla, 2008; Castenmiller e West, 1998).

O estudo sobre a biodisponibilidade de carotenoides é bastante complexo. Estes estudos podem variar entre indivíduos, uma vez que podem ser afetados por diversos fatores, como por exemplo, fatores genéticos ou má absorção de lípidos. A absorção adequada de carotenoides presentes numa determinada matriz alimentar requer as seguintes etapas: 1) digestão da matriz alimentar, 2) formação de micelas lipídicas no trato gastrointestinal, 3) absorção dos carotenoides pelas células da mucosa intestinal, 4) transporte dos carotenoides para o sistema linfático (Rodriguez-Amaya, 2016; Rodriguez-Amaya, 2015; Rodriguez-Amaya et al., 2006; Thakkar e Failla, 2008; van den Berg et al., 2000).

Os métodos que são usados para avaliar a biodisponibilidade englobam estudos efetuados em seres humanos e em animais. Os estudos efetuados em seres humanos são os que melhor avaliam a biodisponibilidade, contudo, estes estudos são extremamente complexos, dispendiosos, invasivos, com um tempo de duração considerável, eticamente questionáveis e muitas vezes com resultados inconclusivos. Os estudos efetuados em animais não são considerados ideais devido às diferenças de metabolismo em relação aos seres humanos. Contudo, a área de investigação tem apostado em métodos mais económicos, reprodutíveis, rápidos e simples, como modelos *in vitro*. Estes modelos simulam o ambiente durante a digestão no organismo humano e permitem a análise de um grande número de amostras em pouco espaço de tempo. O modelo mais usado para analisar a bioacessibilidade de carotenoides é um modelo de digestão estática com absorção celular, na presença de células Caco-2. Este modelo que foi desenvolvido por Garrett et al. (1999) simula um pequeno ambiente intestinal, que permite estudar o mecanismo de absorção e transporte (Rodriguez-Amaya, 2015; Van

Buggenhout et al., 2010; Donhowe et al., 2014; Granado-Lorencio et al., 2007; Lee et al., 1999).

3.4. Importância dos carotenoides para a saúde

Vários estudos epidemiológicos associam a ingestão de alimentos contendo carotenoides a inúmeros benefícios para a saúde, nomeadamente a diminuição do aparecimento e propagação de vários tipos de cancro. Tem sido descrito na literatura que alguns carotenoides, quando ingeridos através de frutas e legumes, exercem uma ação preventiva para um elevado número de doenças (Yahia, 2010; Rao e Rao, 2007). Deste modo, tem sido reportado que os carotenoides desempenham funções biológicas importantes relacionadas em grande parte com a ação antioxidante e com a atividade de pró-vitamina A que alguns carotenoides apresentam (Rao e Rao, 2007; Rodriguez-Amaya, 1997, Gammone et al., 2015). Também tem sido mencionado na literatura outras funções biológicas como a capacidade de regular a transcrição de genes, a melhoria na resposta imunitária e na comunicação das junções comunicantes. Estas funções biológicas estão relacionadas com a prevenção e a redução de vários tipos de doenças como cancros, doenças cardiovasculares, degeneração macular, cataratas, doenças da pele associadas a exposição UV (Cooperstone e Schwartz, 2016; Rao e Rao, 2007; Bendich e Olson, 1989).

3.4.1. Funções biológicas

- Atividade pró-vitamina A

A carência em vitamina A é um dos principais problemas de saúde pública em muitos países em vias de desenvolvimento. Estima-se que afeta em todo o mundo cerca de 127 milhões de crianças e 7,2 milhões de mulheres em período de gestação. A vitamina A é um nutriente muito importante para o organismo humano, sendo essencial no desempenho de funções a nível de visão, desenvolvimento embrionário, crescimento e sistema imunitário (Cooperstone e Schwartz, 2016; Yunusa e Attah, 2016; Stahl e Sies, 2005, Rodriguez-Amaya, 1997).

A carência em vitamina A pode levar ao aparecimento de várias doenças como anemia, enfraquecimento do sistema imunitário, aumento da sensibilidade às doenças infecciosas, xeroftalmia (Cervantes-Paz et al., 2016; Cooperstone e Schwartz, 2016).

Estima-se que a ingestão de carotenoides provenientes de frutas e vegetais fornecem cerca de 30% da DDR de vitamina A em países desenvolvidos, enquanto nos países em vias de desenvolvimento a contribuição destes produtos é maior representando 85% da DDR. Nos países desenvolvidos, a maior fonte de vitamina A são os produtos de origem animal como ovos, leite e seus derivados, óleo de fígado de peixe, entre outros (Yunusa e Attah, 2016; Cervantes-Paz et al., 2016).

Depois de ingerida, a vitamina A é absorvida no intestino, esterificada e conservada no fígado. Nas frutas e vegetais, a vitamina A encontra-se na forma de pró-vitamina A que pode ser metabolizada em vitamina A nos seres humanos e outros animais (Omenn, 1998).

Das 700 estruturas de carotenoides conhecidas, apenas algumas podem ser convertidas em retinol, pela intervenção da enzima β -caroteno-15-15'-mono-oxigenase (EC 1.13.11.21) (Fernández-García et al., 2012). Esta atividade é restrita apenas para os carotenoides que apresentam atividade de pró-vitamina A, isto é, para os carotenoides que possuem um anel β -ionona que não esteja substituído e uma cadeia poliénica com 11 átomos de carbono, como é o caso do α -caroteno, β -caroteno e β -criptoxantina. O β -caroteno é o que exibe maior atividade de pró-vitamina A uma vez que contém o equivalente a duas moléculas de retinol, enquanto os outros dois contêm apenas o equivalente a uma molécula de retinol (Cervantes-Paz et al., 2016; Cooperstone e Schwartz, 2016; Burri, 2015; Fernández-García et al., 2012; Rodriguez-Amaya e Kimura, 2004).

- Ação antioxidante

Os carotenoides fazem parte da classe de antioxidantes não enzimáticos que possuem a capacidade de neutralizar espécies reativas de oxigénio (ROS) que são originadas durante o metabolismo aeróbio e processos patológicos. As ROS provocam a oxidação de macromoléculas biológicas fundamentais e os lípidos insaturados que se encontram nas membranas celulares são os seus principais alvos. Quando se encontram em quantidades elevadas no organismo humano, as ROS provocam o stress oxidativo das células e do tecido. O stress oxidativo é um fator crítico e o principal responsável pelo processo patogénico de muitas doenças, que ocorre quando, em determinadas situações, as defesas não são suficientes (Majeed et al., 2016; Stahl e Sies, 2005; Agarwal e Rao, 2000).

Dessa forma, os carotenoides poderão desempenhar potencialmente um papel de proteção e prevenção de doenças degenerativas como vários tipos de cancro, diabetes doenças cardiovasculares e de visão (Stahl e Sies, 2003; Rao e Agarwal, 1999; Tapiero

et al., 2004; Xavier e Pérez-Gálvez, 2016; Majeed et al., 2016; Stahl e Sies, 2005; Halliwell, 1996; Fiedor e Burda, 2014; Bendich e Olson, 1989).

Os carotenoides são muito provavelmente os antioxidantes mais envolvidos na neutralização do oxigénio singlete e dos radicais peróxido (Stahl e Sies, 2003; Fiedor e Burda, 2014; Tapiero et al., 2004).

A capacidade na captura do oxigénio singlete pelos carotenoides depende essencialmente do número de ligações duplas conjugadas característico de cada carotenoide. Foi reportado na literatura maior eficiência em carotenoides com nove ou mais ligações duplas conjugadas. O licopeno é um dos carotenoides mais eficientes na captura do oxigénio singlete (Cooperstone e Schwartz, 2016; Stahl e Sies, 2003; Young e Lowe, 2001; Rodriguez-Amaya e Kimura, 2004; Stahl e Sies, 1996).

Para que a capacidade antioxidante dos carotenoides seja considerada eficiente, é necessário que os carotenoides estejam presentes no plasma humano em concentrações suficientes e no local específico onde as ROS são geradas (Erdman et al., 2009).

3.4.2. Prevenção de doenças

Uma alimentação saudável desempenha um papel muito importante na prevenção de inúmeras doenças crónicas.

Como exemplo, as doenças cardiovasculares, nomeadamente a doença arterial coronária é uma das principais causas de morte nos países desenvolvidos (Yoshihara et al., 2010; Gammone et al., 2015).

Os principais fatores de risco associados a doença arterial coronária são: hipertensão, tabagismo, diabetes, obesidade e hipercolesterolemia (Gammone et al., 2015).

Na literatura, existem evidências que associam o consumo de licopeno a uma diminuição do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Petyaev, 2016; Rao e Rao, 2007; Bramley, 2000; Kohlmeier et al., 1997).

A oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) desempenha um papel crucial na patogénese da doença arterial coronária uma vez que provoca a modificação das LDL o que contribui para o desenvolvimento inicial da doença arterial coronária. Dessa forma, o consumo de antioxidantes, nomeadamente do licopeno poderá permitir a diminuição do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares pela inibição da modificação das LDL. Como o licopeno é transportado pelas LDL no plasma, muitos autores sugerem que

desempenha um papel de proteção contra oxidação destas proteínas (Yadav et al., 2016; Ried e Fakler, 2011; Krinsky e Johnson, 2005; Tapiero et al., 2004).

O cancro é a maior causa de morte assinalada em todo o mundo (WHO, 2016). Em 2012, foram registadas cerca de 8,2 milhões de mortes devido a esta doença (WHO, 2016). Até 2030, prevê-se cerca de 13,2 milhões de mortes relacionadas com o cancro (Bray et al., 2012).

Em 1981 surgiram na literatura os primeiros relatos que associavam a ingestão de β -caroteno à redução do risco de desenvolvimento de doenças cancerígenas (Peto et al., 1981). Desde esta altura, inúmeros estudos epidemiológicos investigaram a relação entre os níveis de carotenoides no plasma humano com a redução do risco de desenvolvimento de muitas doenças como o cancro da mama, cancro do cólon e do reto, cancro da próstata, cancro do pulmão, entre outros (Cooperstone e Schwartz, 2016; Panic et al., 2016; Boeke et. al., 2014; Pannellini et al., 2010).

O risco de aparecimento e desenvolvimento de certos tipos de cancro pode ser reduzido através de uma alimentação saudável, rica em alimentos que contenham compostos com atividade antioxidante. Alguns estudos epidemiológicos defendem a ideia de que a ingestão de carotenoides presentes na dieta alimentar, nomeadamente o licopeno presente no tomate, apresenta uma proteção contra o risco de desenvolvimento do cancro da próstata (Bendich, 2013). O efeito antioxidante é um dos mecanismos de ação que mais contribuem para o efeito protetor (Fiedor e Burda, 2014).

Existem muitos estudos na literatura que defendem a relação entre a ingestão de luteína e zeaxantina presentes na dieta alimentar com a diminuição do risco de desenvolvimento da degeneração macular relacionada com a idade (DMRI). Estes estudos defendem que a luteína e a zeaxantina possuem a capacidade de prevenir e/ou retardar esta doença degenerativa. A DMRI é uma doença que provoca perda de visão central. É uma das principais causas de deficiência visual, cegueira irreversível em idosos e cataratas. A luteína e zeaxantina, que são os carotenoides responsáveis pela coloração da mácula onde se encontram presentes em elevadas concentrações, atuam na retina como poderosos antioxidantes, reduzindo os danos do stress oxidativo para as células da retina (Bernstein et al., 2016; Murillo e Fernandez, 2016; Nwachukwu et al., 2015; Chucair et al., 2007).

3.5. Fatores que influenciam a composição em carotenoides dos alimentos

A estação do ano, o clima, e outros fatores como o estado de maturação, a variedade, localização geográfica, meio de cultivo, processamento e armazenamento, são os principais fatores que influenciam a composição em carotenoides nos alimentos. Entre os fatores citados, o clima é um dos mais importantes, uma vez que influencia diretamente as plantas, os animais e o solo (Rodriguez-Amaya, 2016; Walsh et al., 2015; Maiani et al., 2009; Rodriguez-Amaya et al., 2006; Rodriguez-Amaya, 2001).

3.5.1. Estação do Ano

A época do ano em que são colhidos os frutos e os produtos hortícolas exercem uma grande influência no teor em carotenoides apresentado por esses produtos (Walsh et al., 2015).

Para muitos frutos e produtos hortícolas, a exposição ao sol e a altas temperaturas favorece a carotenogénese, mas também pode promover a fotodegradação que provoca a redução do teor em carotenoides. Isto acontece porque nos tecidos fotossintéticos, quando expostos a diferentes condições climáticas, podem ocorrer dois processos distintos: a biossíntese e a fotodegradação (Rodriguez-Amaya et al., 2008; Rodriguez-Amaya et al., 2006; Azevedo e Rodriguez-Amaya, 2005). Em produtos hortícolas (folhosos) cultivados em campos abertos, foi reportado que o teor em carotenoides é inferior no verão o que sugere que a exposição excessiva ao sol e a altas temperaturas favorece a fotodegradação (Rodriguez-Amaya et al., 2008; Rodriguez-Amaya et al., 2006; Azevedo e Rodriguez-Amaya, 2005; Heinonen et al., 1989).

Contudo, em amostras de produtos hortícolas cultivadas em estufas revestidas de polietileno (proteção plástica) foi reportado teores superiores em carotenoides para amostras recolhidas na estação do verão o que sugere que o revestimento em polietileno permitiu uma proteção contra a exposição excessiva a temperaturas elevadas do verão favorecendo a carotenogénese (Walsh et al., 2015; Rodriguez-Amaya et al., 2008; Azevedo-Meleiro e Rodriguez-Amaya, 2005).

Em contrapartida, para amostras recolhidas na estação de inverno foi reportado teores inferiores em carotenoides o que sugere que o revestimento em polietileno reduziu a possibilidade de exposição ao sol não favorecendo a carotenogénese (Walsh et al., 2015; Rodriguez-Amaya et al., 2006; Kimura e Rodriguez-Amaya, 2003).

Desta forma, o que se encontra reportado na literatura é que o uso de revestimento plástico tanto pode proporcionar a proteção contra a fotodegradação no verão como a redução da biossíntese de carotenoides no inverno (Walsh et al., 2015).

Alguns autores reportaram estudos sobre o efeito da sazonalidade na composição em carotenoides de várias amostras de alimentos da mesma espécie, nomeadamente de couves, tomates e abacates. Nestes estudos, o que se verifica é que independentemente da localização geográfica, da variedade, do meio e das técnicas de cultivo, a estação do ano exerce influência na composição em carotenoides (Walsh et al., 2015; Lu et al., 2009; Raffo et al., 2006; Azevedo e Rodriguez-Amaya, 2005; Martinez-Valverde et al., 2002; Müller, 1997). No anexo 1 estão apresentados os teores em carotenoides obtidos por diversos autores.

Em Portugal, muitos frutos e produtos hortícolas estão disponíveis nas diferentes estações do ano, apresentando-se no Anexo 2 a época mais aconselhável para o consumo desses produtos. (<http://www.deco.proteste.pt/alimentacao/produtos-alimentares/dicas/fruta-legumes-epoca-ideal>).

3.5.2. Outros fatores

Para uma dada espécie, é possível existirem diferenças na sua composição. Essas diferenças que tanto podem ser qualitativas como quantitativas e são resultado da sua variabilidade natural, mas também da sua variedade. Na literatura, encontram-se documentadas algumas dessas diferenças principalmente em frutos e produtos hortícolas. Alguns autores analisaram a influência da variedade na composição em carotenoides de algumas uvas, tomate, brócolos e batata-doce e reportaram diferenças significativas tanto a nível quantitativo como qualitativo (Kim et al., 2015; Bunea et al., 2012; Singh et al., 2007; Hart e Scott, 1995; Rouseff et al., 1992).

O estado de maturação de muitos frutos e produtos hortícolas também afeta consideravelmente a composição em carotenoides. A maturação dos frutos é normalmente acompanhada por um aumento da carotenogénese, isto é, da biossíntese de carotenoides que provoca um acréscimo no teor em carotenoides. Este aumento é facilmente visível quando se observa, por exemplo, a mudança de coloração de um fruto (Walsh et al., 2015; Rodriguez-Amaya et al., 2006; Rodriguez-Amaya, 2001; Fraser et al., 1994). Alguns autores reportaram estudos realizados em frutos (manga, fruta-pão e kiwi) e verduras (folhas de couve, alface, espinafre da Nova Zelândia) recolhidos em diferentes estágios de maturação. Para a fruta-pão, a manga e as folhas de alface, o que se verifica

é que processo de maturação conduz a um aumento no teor em carotenoides (Englbeger et al., 2013; Azevedo-Meleiro e Rodriguez-Amaya, 2005; Mercadante e Rodriguez-Amaya, 1998). No entanto para o kiwi, as folhas de couve e espinafre da Nova Zelândia, essa relação não é verificada uma vez que o processo de maturação conduz a um decréscimo no teor em carotenoides. (Lefsrud et al., 2007; Azevedo e Rodriguez-Amaya, 2005). O kiwi apresenta teores em carotenoides inferiores com a maturação por conservar a sua cor verde (Rodriguez-Amaya, 2001).

Relativamente a localização geográfica, o clima é um dos fatores mais influenciados pela localização geográfica. Os diferentes tipos de clima (frio, quente, temperados) dependem da localização geográfica. Diversos autores reportaram estudos sobre o efeito da localização geográfica na composição em carotenoides dos alimentos. *Rodriguez-Amaya et al. (2008)* reportaram que as mangas da mesma variedade produzidas em climas quentes do nordeste do Brasil apresentaram teores superiores em carotenoides comparativamente com os frutos produzidos em climas temperados, nomeadamente a Sudeste do Brasil. *Wall et al. (2006)* reportaram também uma variação significativa nos teores em carotenoides para diferentes variedades de bananas e papaias recolhidas em várias localizações.

O meio de cultivo também exerce uma grande influência na composição em carotenoides de frutos e produtos hortícolas. O teor em carotenoides de legumes e vegetais difere quando comparamos a agricultura biológica com a agricultura convencional que faz uso de agroquímicos como fertilizantes (Walsh et al., 2015, Rodriguez-Amaya et al., 2008; Rodriguez-Amaya et al., 2006). *Mercadante e Rodriguez-Amaya (1991)* realizaram um estudo para a comparação da composição em carotenoides utilizando a agricultura convencional e a biológica em amostras de couves da mesma variedade e com o mesmo grau de maturação. O estudo revelou diferenças significativas no teor em carotenoides e foi registado um maior teor em amostras de couve cultivadas em meio biológico. Em contrapartida, *Kimura e Rodriguez-Amaya (2003)* registaram um maior teor em carotenoides nas amostras de alfaces produzidas a partir da agricultura tradicional, comparativamente com a agricultura hidropónica. *Beltrán-González et al. (2008)* reportaram teores superiores de carotenoides em amostras de sumo de tangerinas produzidas por meio da agricultura biológica. Também *Lester e Buslig (2007)* reportaram um maior teor em licopeno em amostras de uvas cultivadas em agricultura convencional, em comparação com a agricultura biológica.

As alterações que se verificam nos carotenoides após o processamento dos alimentos dependem em grande parte do tipo de alimento, do método utilizado, da temperatura e do tempo. O processamento e o armazenamento dos alimentos podem levar a oxidação

ou isomerização as quais provocam alterações na composição em carotenoides (Rodriguez-Amaya, 2016; Walsh et al., 2015; Maiani et al., 2009; Rodriguez-Amaya et al., 2006; Rodriguez-Amaya, 2001).

O processo de biossíntese de carotenoides continua após a colheita, decorrendo durante o armazenamento de muitas frutas. Para tal, é necessário que as frutas se mantenham intactas de forma a preservar o sistema enzimático responsável pela carotenogénese (Walsh et al., 2015; Maiani et al., 2009; Rodriguez-Amaya et al., 2008; Rodriguez-Amaya et al., 2006; Rodriguez-Amaya, 2001). Quanto aos produtos hortícolas, o processo de biossíntese de carotenoides é interrompido após a colheita, dando lugar a degradação principalmente se o armazenamento for efetuado a altas temperaturas que provocam a degradação das folhas (Walsh et al., 2015; Maiani et al., 2009; Rodriguez-Amaya et al., 2008; Rodriguez-Amaya et al., 2006; Rodriguez-Amaya, 2001).

Deste modo, as condições de armazenamento e também de processamento dos alimentos exercem uma grande influência na composição e teor de carotenoides nos alimentos (Walsh et al., 2015; Maiani et al., 2009; Rodriguez-Amaya et al., 2008; Rodriguez-Amaya et al., 2006; Rodriguez-Amaya, 2001).

Durante o armazenamento ou processamento de alimentos, ocorrem perdas na composição em carotenoides devido a processos de isomerização, oxidação enzimática e não enzimática (decomposição térmica). O fenómeno de isomerização é desencadeado maioritariamente durante os processos térmicos (ex: cozedura, fritura, fervura) e também devidos a processos físicos (ex: corte, trituração) à ação de ácidos orgânicos e através do calor e luz, condições que provocam uma perda de atividade de provitamina A (Rodriguez-Amaya et al., 2006).

Fenómenos de oxidação enzimática e não enzimática são desencadeados pela ação da luz, calor, presença de metais, enzimas e peróxidos e podem ser inibidos pela ação de antioxidantes. A oxidação enzimática ocorre logo após o descasque, corte e trituração. É recomendado o consumo ou o processamento térmico dos alimentos logo após essas operações. As condições de processamento, a temperatura de armazenamento, o uso de embalagens que permitem o contacto com a luz e com oxigénio aumentam o risco de oxidação (Rodriguez-Amaya et al., 2008; Rodriguez-Amaya et al., 2006; Rodriguez-Amaya, 2001).

3.6. Métodos analíticos para a determinação de carotenoides

Uma vez que os carotenoides diferem nas suas propriedades (polaridade, estabilidade, biodisponibilidade, atividade antioxidante) e funções, é essencial a quantificação e identificação precisa e rigorosa dos carotenoides individuais (Rodriguez-Amaya, 2016; Amorim-Carrilho et al., 2014; Rivera e Canela-Garayoa, 2012).

O procedimento mais comum para extração dos carotenoides da matriz é a aplicação de um solvente orgânico. Na seleção do solvente mais adequado, é necessário estar atento às diferentes polaridades dos carotenoides e à estrutura da matriz analítica. Além disso, a suscetibilidade dos carotenoides à oxidação deve ser considerada ao desenvolver um método para extração uma vez que os carotenoides em solução podem ser muito sensíveis à exposição à luz, ao calor, a ácidos ou ao oxigénio (Amorim-Carrilho et al., 2014).

Apesar da extração líquido-líquido e a extração sólido-líquido serem as técnicas mais frequentemente aplicadas em amostras de alimentos, outros métodos de extração foram também relatados para análise de carotenoides como: extração com fluidos supercríticos (SFE), extração líquida pressurizada (PLE), extração acelerada de solvente (ASE), extração assistida por ultra-sons (EAU) e extração assistida por micro-ondas (MAE). Estes métodos têm sido usados como alternativas de extração ambientalmente melhores (Amorim-Carrilho et al., 2014; Li et al., 2013; Sun et al., 2012; Bohoyo-Gil, 2012).

As amostras de produtos naturais contêm tipicamente os carotenos não polares e as xantofilas mais polares. Seja qual for o método utilizado, o processo cromatográfico deve ser capaz de lidar com esta gama de polaridade (Machmudah e Goto, 2013).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase inversa com um detetor de fotodíodos ultravioleta visível (UV/Vis) tem sido a técnica analítica preferida, mas a cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) tem vindo a ser cada vez mais utilizada (Rodriguez-Amaya, 2016).

A técnica HPLC acoplada à espectrometria de massa (MS) e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) têm sido úteis na identificação inequívoca de isómeros geométricos de carotenoides (Rodriguez-Amaya, 2016).

3.6.1. Métodos de extração e saponificação

A saponificação (hidrólise alcalina) é um passo destinado a remover clorofilas e lípidos indesejados e hidrolisar os ésteres de ácidos gordos de xantofilas, tais como β -criptoxantina, luteína e zeaxantina, o que pode simplificar a separação cromatográfica. Por este motivo como as xantofilas podem ser encontradas na sua forma livre ou numa forma de ácidos gordos esterificados, são frequentemente analisados após a saponificação (Amorim-Carrilho et al., 2014; Kopec et al., 2012).

A saponificação só deve ser incluída no procedimento analítico se for indispensável. É desnecessário, por exemplo, na análise de vegetais folhosos, tomate e cenoura, que são materiais de baixo teor lipídico e essencialmente isentos de ésteres de carotenol. Se necessário, este passo deve ser cuidadosamente avaliado e otimizado, e a subsequente lavagem cuidadosamente efetuada para evitar a perda de carotenoides na fase aquosa que é descartada (Rodriguez-Amaya, 2016; Amorim-Carrilho et al., 2014).

Como os carotenoides são compostos lipofílicos, não são solúveis em água. São geralmente extraídos usando uma mistura de solventes orgânicos. Os solventes utilizados dependem da matriz da amostra e da polaridade relativa dos carotenoides de interesse. As xantofilas polares, tais como a luteína, são mais solúveis em álcoois, enquanto que os carotenos não polares, tais como o β -caroteno, são mais solúveis em solventes hidrofóbicos como por exemplo o éter de petróleo e n-hexano (Kiokias e Varzakas, 2016; Kopec et al., 2012, Quirós e Costa, 2006; Rodriguez-Amaya, 2001).

Uma grande variedade de misturas de solventes tem sido utilizada por diferentes investigadores para extrair os carotenoides dos alimentos, como por exemplo, acetona / diclorometano, acetona / etanol, acetona / hexano, acetona / éter de petróleo, hexano / éter dietílico, hexano / etanol / acetona / tolueno, metanol / Tetrahidrofurano (THF), hexano / acetato de etilo. Contudo, a mistura de etanol / hexano (4:3) tem sido uma das combinações mais comuns em amostras de alimentos (Amorim-Carrilho et al., 2014; Kopec et al., 2012).

Para uma extração eficiente, a mistura de solventes deve ser capaz de penetrar na matriz alimentar e dissolver eficazmente os diferentes carotenoides presentes na amostra, sem os alterar ou degradar (Rodriguez-Amaya, 2016).

No entanto, como os carotenoides são encontrados numa grande variedade de alimentos, os procedimentos de extração devem ser adaptados à amostra a ser analisada (Rodriguez-Amaya, 2016; Machmudah e Goto, 2013).

A extração de carotenoides com solventes orgânicos gera grandes quantidades de resíduos cuja eliminação é um problema ambiental. Uma alternativa ecológica aos métodos de extração líquido-líquido anteriormente mencionados é a extração com fluido supercrítico CO₂ (SFE) (Rodriguez-Amaya, 2016; Kopec et al., 2012).

O dióxido de carbono é o fluido supercrítico mais utilizado, uma vez que apresenta uma baixa temperatura crítica (31°C) que o torna ideal para a extração de compostos termicamente instáveis. No entanto, o dióxido de carbono apresenta uma polaridade baixa e torna a extração de compostos polares muito difícil. Esta limitação pode ser resolvida através da adição de um modificador orgânico, tal como metanol ou etanol, a fim de aumentar a solubilidade (Rodriguez-Amaya, 2016; Mezzomo e Ferreira, 2016; Machmudah e Goto, 2013; Kopec et al., 2012; Mathiasson et al., 2002). Foi demonstrado que os modificadores de solventes aumentam a eficiência de SFE devido ao aumento da solubilidade do analito no CO₂ supercrítico, diminuindo a sua interação com a matriz alimentar. No entanto, ainda são necessários mais estudos de otimização e de validação (Mezzomo e Ferreira, 2016; Kopec et al., 2012; Spanos et al., 1993).

3.6.1.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Nas últimas décadas, a análise de alimentos pela técnica de (HPLC) foi amplamente revista e continua a ser o método preferido para separar, identificar e quantificar carotenoides em alimentos e amostras biológicas permanecendo, hoje, o principal método analítico (qualitativo e quantitativo) para análise de carotenoides em matrizes complexas (Finkel'shtein, 2016; Kopec et al., 2012).

A técnica de HPLC é versátil, robusta, e amplamente utilizada para o isolamento de produtos naturais. Esta técnica cromatográfica é utilizada em fitoquímica e química analítica para identificar, quantificar e purificar os componentes individuais da mistura (Bhardwaj et al., 2015; Gupta et al., 2012).

O princípio da técnica de HPLC consiste na injeção de uma amostra em solução numa coluna com material poroso (fase estacionária) e um líquido (fase móvel) que é bombado a alta pressão para a coluna (a pressão pode atingir 40 MPa). A separação da amostra baseia-se nas diferenças das taxas de migração através da coluna resultante da diferente partição da amostra entre a fase estacionária e móvel (Bhardwaj et al., 2015; Gupta et al., 2012; Kumar et al., 2015).

O sistema utilizado neste tipo de cromatografia é constituído por um injetor, um sistema de bombagem, uma coluna cromatográfica, um detetor e sistema de recolha e processamento de dados. Conforme se pode verificar na figura 2.

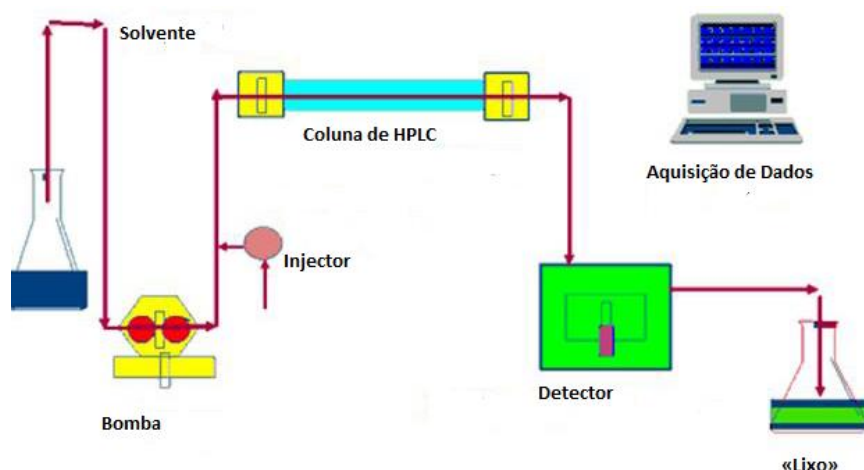


Figura 3.2 – Sistema de análise por HPLC (Adaptado de Bhardwaj et al., 2015).

Durante o desenvolvimento do método, é necessário selecionar um conjunto de condições iniciais (detetor, coluna, fase móvel). A coluna é, naturalmente, a peça de partida e central de um cromatógrafo. Uma coluna adequadamente selecionada pode produzir uma boa separação cromatográfica, que fornece uma análise precisa e confiável (Gupta et al., 2012; Kumar et al., 2015).

A escolha da melhor coluna requer conhecimento sobre as características químicas da fase estacionária, capacidade de retenção dos compostos, tamanho de partícula e a dimensão da coluna. Existem vários tipos de matrizes para suporte da fase estacionária, incluindo sílica, polímeros, alumina e zircónio. A sílica é a matriz mais comum para colunas de HPLC. As matrizes de sílica são robustas e não tendem a comprimir sob pressão. A sílica é quimicamente estável na maioria dos solventes orgânicos e em sistemas de baixo pH (Gupta et al., 2012; Kumar et al., 2015).

A natureza da fase estacionária determina se a coluna a ser utilizada é de fase normal (NP-HPLC) ou fase inversa (RP-HPLC). A cromatografia de fase normal utiliza uma fase estacionária polar e uma fase móvel não polar (p.e. hexano). Uma coluna típica tem um diâmetro interno de cerca de 4,6 mm, e um comprimento de 150 a 250 mm (Kumar et al., 2015).

Na cromatografia de fase inversa o solvente utilizado na fase móvel (p.e. mistura água e metanol) apresenta uma polaridade superior ao enchimento da fase estacionária (sílica modificada). Assim, os componentes que apresentam maior polaridade são eluídos em primeiro, pois apresentam uma maior afinidade com a fase móvel. Na fase inversa, o tamanho da coluna é semelhante, mas a sílica é modificada e tornada não-polar, ligando-se a hidrocarbonetos de cadeia longa - tipicamente com 8 ou 18 átomos de carbono (colunas C8 e C18) (Kumar et al., 2015).

Existem diversos tipos de detetores que podem ser utilizados em sistemas de HPLC cuja função é detetar a presença de um composto na mistura que sai da coluna proporcionando um sinal elétrico a um dispositivo de aquisição de dados. Os principais tipos de detetores utilizados em HPLC são índice de refração (IR), UV-VIS, fluorescência, eletroquímico, detetores de condutividade e espectrómetro de massa (Bhardwaj et al., 2015; Gupta et al., 2012; Kumar et al., 2015). Neste trabalho, foi utilizado o detetor UV/Vis com uma rede de díodos.

As vantagens de HPLC incluem eficiência, tempos de corrida de curta duração e sensibilidade. A técnica de HPLC de fase inversa é de longe a mais comum na análise de carotenoides, embora alguns métodos de fase normal tenham sido desenvolvidos para a separação de misturas de xantofilas (Rodriguez-Amaya, 2016; Finkel'shtein, 2016; Kopec et al., 2012).

A deteção por UV/Vis utilizando uma rede de díodos (DAD) é mais comum para análise de carotenoides por HPLC, embora outros detetores, como detetores eletroquímicos (ECD), fluorescência e MS possam também ser usados (Finkel'shtein, 2016, Hrvolová et al., 2016, Irakli et al., 2016; Boboyo-Gil et al., 2012; Irakli et al., 2011).

A técnica de HPLC de fase inversa em colunas C18 tem sido o modo preferido para separar e analisar carotenoides (Machmudah e Goto, 2013).

As colunas C18 permitem a separação de uma ampla gama de analitos, especialmente aqueles com cadeias relativamente curtas e pesos moleculares baixos. A popularidade da coluna C18 deriva das suas interações hidrofóbicas fracas com os analitos, compatibilidade com a maioria dos solventes e com a faixa de polaridade dos carotenoides e uma ampla disponibilidade comercial (Kumar et al., 2016; Machmudah e Goto, 2013).

As colunas C30 são uma escolha particularmente boa para uma melhor separação e alta resolução de isómeros geométricos dos carotenos menos polares, principalmente licopeno e β -caroteno. No entanto, quando aplicadas à análise geral de carotenoides, as colunas C30 permitem obter perfis semelhantes aos obtidos com colunas C18

convencionais, mas com tempos de corrida cromatográfica mais longos. As limitações na aplicação de colunas C30 são, por conseguinte, a sua capacidade para separar apenas isómeros geométricos de carotenoides com uma gama limitada de polaridade e os seus tempos longos de corrida cromatográfica (geralmente 60-100 min, em oposição a 10-25 min para colunas C18 (Rodriguez-Amaya, 2016; Amorim-Carrilho et al., 2014; Kopec et al., 2012, Sander et al., 2000).

A eluição dos carotenoides pode ser feita em modo isocrático ou em gradiente. A eluição em gradiente tem as vantagens de maior poder de resolução e sensibilidade melhorada. No entanto, tem várias desvantagens: maior complexidade; exigência de equipamento mais sofisticado e dispendioso; necessidade de reequilíbrio de coluna entre corridas; reprodutibilidade frequentemente fraca. A eluição isocrática é rápida e resulta em tempos de linha de base estáveis e mais reprodutíveis. É o método mais adequado para análises de rotina (Rodriguez-Amaya, 2016; Machmudah e Goto, 2013; Rivera e Canela-Garayoa, 2012).

A regulação da temperatura é recomendada para manter a reprodutibilidade. As variações na temperatura da coluna resultam numa flutuação substancial dos tempos de retenção dos carotenoides. A temperatura também pode influenciar a seletividade (Machmudah e Goto, 2013).

As propriedades mais importantes a serem consideradas na seleção da fase móvel para a análise de carotenoides são a polaridade, viscosidade, volatilidade e toxicidade. O acetoneitrilo tem sido amplamente utilizado devido à sua baixa viscosidade (baixo ruído na deteção na zona do UV), requer uma pressão da coluna inferior e, em geral, boa forma de pico (Amorim-Carrilho et al., 2014; Machmudah e Goto, 2013).

3.6.1.2. Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

A técnica de HPLC-DAD fornece um grande conjunto de dados fiáveis e detalhados sobre a composição de carotenoides dos alimentos. No entanto, devido a problemas ambientais e económicos, existe uma procura contínua por métodos mais rápidos que usam menos solventes orgânicos (Rodriguez-Amaya, 2016).

Desenvolvimentos tecnológicos em termos de colunas e instrumentação levaram a UHPLC. A técnica de UHPLC, em comparação com a técnica de HPLC, utiliza colunas com partículas de menor diâmetro, mais curtas, menores tempos de separação fazendo com que as análises sejam mais rápidas (10 min), com caudais mais reduzidos e menor

volume de injeção, conduzindo a uma maior resolução e sensibilidade (Rodriguez-Amaya, 2016, Gupta et al., 2015; Rivera e Canela-Garayoa, 2012).

Estes métodos devem ser submetidos a ensaios laboratoriais e interlaboratoriais para que possam garantir resultados fiáveis (Rodriguez-Amaya, 2016; Kaulmann et al., 2014; Rodriguez-Amaya, 2010).

Os métodos de UHPLC não são muito comuns para a quantificação da vasta gama de carotenoides, embora alguns autores os tenham usado para analisar simultaneamente carotenoides e vitaminas lipossolúveis (Kopeck et al., 2012; Chauveau-Duriot et al., 2010).

3.6.1.3. Outras técnicas de análise

Outro método alternativo de separação e análise de carotenoides em matrizes alimentares consiste na cromatografia do fluido supercrítico (SFC) que utiliza dióxido de carbono como fase móvel. A baixa viscosidade e a alta difusividade permitem que o tempo de análise seja muito menor (Finkel'shtein, 2016; Saini e Keum, 2016; Bijttebier et al., 2014; Matsubara et al., 2012).

A cromatografia líquida unidimensional tem sido usada como uma ferramenta de separação para análise de diversos compostos, incluindo em análise de alimentos. No entanto, nem sempre proporciona a resolução e o poder de separação necessários para obter os melhores resultados em termos de identificação de analitos em amostras de alimentos, especialmente em casos muito complexos. A cromatografia líquida multidimensional tem emergido como uma alternativa aliciante para analisar matrizes complexas, uma vez que permite a combinação de dois ou mais passos de separação independentes ou quase independentes, aumentando significativamente o poder de separação em relação às técnicas unidimensionais (Rodriguez-Amaya, 2016; Amorim-Carrilho et al., 2014).

A cromatografia líquida bidimensional é realizada em duas colunas analíticas com seletividade ortogonal. Esta técnica possui um dispositivo de transferência (uma ou duas válvulas de permutação) posicionado entre as duas colunas que permite o isolamento e a re-injeção das frações eluídas na segunda coluna (Cacciola, 2016; Dugo et al., 2009).

Apesar das técnicas de cromatografia do fluido supercrítico e cromatografia líquida bidimensional terem apresentado grandes possibilidades de realização de separações complexas de carotenoides, também apresentam equipamentos complexos e caros e tempos de análises com cerca de 140 min (Bijttebier et al., 2014).

No Anexo 3 encontram-se alguns dos métodos cromatográficos reportados na literatura para a determinação de carotenoides em diversas matrizes alimentares.

3.7. Material de Referência Interno

Após validação de um método de análise, deve exercer-se um controlo da sua execução de modo a garantir que as condições de validade do método se mantêm (Cortez et al, 1996).

Deste modo para poder ter confiança na qualidade dos resultados obtidos, o Laboratório deve possuir um sistema de Controlo da Qualidade (CQ). A definição de controlo da qualidade, segundo a ISO 8402, consiste num “conjunto das técnicas e atividades de carácter operacional utilizadas com vista a responder às exigências da qualidade” (Cortez et al, 1996).

As ações de CQ podem ser divididas em internas e externas. As ações externas consistem em ações de CQ efetuadas pelo laboratório, mas cuja realização depende de uma intervenção exterior ao laboratório. As ações internas consistem em ações de CQ cuja implementação depende apenas da vontade e meios do laboratório, e não de um fator externo (Cortez et al, 1996).

Nas ações de CQ interno, a periodicidade deve estar de acordo com o tipo de amostras e análises efetuadas. Em geral, estas ações visam controlar a precisão dos resultados produzidos pelo Laboratório. As ações de CQ interno mais utilizadas são: análise de amostras em duplicado, uso de amostras-cegas, aplicação do método de adição de padrão e a utilização de material de referência interno (MRI) (Cortez et al, 1996).

A utilização do MRI permite um melhor controlo da qualidade dos resultados obtidos e, também, a redução de custos pela diminuição da frequência da utilização do material de referência certificado (MRC). Simultaneamente possibilita a redução do número de replicados por amostra reduzindo assim, o consumo de fase móvel (Cortez et al, 1996).

Os MRI devem apresentar uma estabilidade tal que permita o controlo da precisão. Para análises de rotina, as concentrações utilizadas no MRI devem ser parecidas com as das amostras. Quanto à frequência de utilização dos MRI, esta deve ser estabelecida de acordo com as características de cada análise, sendo aconselhado constituírem uma fração não inferior a 5% do total das análises para os ensaios de rotina. Esta periodicidade deve aumentar significativamente, no caso de ensaios pouco frequentes (Cortez et al, 1996).

As cartas de controlo são uma parte muito importante do sistema da qualidade interno uma vez que permitem o controlo da qualidade de resultados através de uma representação gráfica. A utilização das cartas de controlo é um dos meios mais eficientes de detectar erros e de exercer e visualizar um controlo contínuo sobre os resultados produzidos.

As cartas de controlo partem do princípio que a ocorrência de erros é aleatória e que distribuição de pontos em torno do valor médio (\bar{x}) segue a Lei Normal (ou de Gauss). Desta forma, a probabilidade de um ponto se situar a mais de 2 desvios-padrão ($2s$) do valor médio é superior a 5%, e a mais de 3 desvios-padrão ($3s$) excede 0.3%.

Assim, na carta de controlo representam-se para além de uma linha central correspondente ao valor médio (\bar{x}), as linhas de $\bar{x} \pm 2s$, também designadas como linhas de aviso e as linhas de $\bar{x} \pm 3s$, também designadas como linhas de controlo.

Para elaborar uma carta de controlo de médias é necessário estabelecer por ensaios prévios qual o valor médio e o respectivo desvio-padrão.

3.8. Parâmetros Estatísticos

O desvio-padrão é um parâmetro estatístico que representa a forma mais utilizada de quantificação da dispersão de uma população estatística (infinita). O desvio-padrão informa-nos quanto um elemento individual da população se pode desviar do valor da média. Estatisticamente, 95% da população encontra-se num intervalo de $\pm 2s$, em torno da média. Para uma população limitada, utiliza-se o conceito de desvio-padrão estimado, que se apresenta usualmente por “s”, e se refere usualmente, como desvio-padrão.

A incerteza de um resultado é caracterizada segundo o Guia ISO/IEC 99:2008 como um “parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores da grandeza que são atribuídos à mensurada a partir das informações usadas” (Guia ISO/IEC 99, 2008). Para o cálculo da incerteza deve ser considerada não só a precisão do laboratório, mas também a sua exatidão, se se tomar em conta que o valor verdadeiro deve estar compreendido dentro do intervalo de incerteza atribuído ao valor obtido (Cortez et al, 1996).

Por este motivo à determinação de qualquer parâmetro está sempre associada uma determinada incerteza de medição. Quando a incerteza for corretamente estimada, ela pode ser considerada como uma medida da qualidade do resultado, isto é, quanto menor a incerteza maior a qualidade (Cortez et al, 1996).

Para o cálculo das incertezas dos resultados recorre-se ao “Guia para a Quantificação da incerteza em Ensaios Químicos” do Instituto Português da Acreditação (IPAC) que permite calcular segundo três abordagens diferentes: a abordagem “passo a passo”, abordagem baseada em dados de ensaios interlaboratoriais e abordagem baseada em dados de validação e do controlo interno da qualidade (IPAC, 2007). A abordagem baseada em dados de validação consiste na combinação das incertezas determinadas para a precisão e exatidão do método analítico (IPAC, 2007).

A incerteza relativa associada à precisão é dada pela expressão (4.4) (IPAC, 2007):

$$u_{r(\text{precisão})} = \frac{Si(j,k)}{\bar{x}} \quad (4.4)$$

Em que:

$u_{r(\text{precisão})}$ – incerteza relativa associada à precisão

$Si(j,k)$ – desvio padrão da precisão intermédia obtido a partir da equação (4.5)

\bar{x} – média da concentração determinada

O desvio padrão de precisão intermédia $Si(j,k)$ é dado pela equação (4.5):

$$Si(j,k) = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2} \quad (4.5)$$

Em que:

t – total de amostras analisadas

n – nº de ensaios efetuados por amostra

j – nº da amostra, $j=1, t$

k - nº do ensaio da amostra, $j, k= 1, n$

y_{jk} – valor do resultado k para a amostra j

\bar{y}_j - representa a média aritmética dos resultados da amostra j

Quando se recorre ao MRC para a determinação da exatidão, é possível calcular a recuperação média do método (\bar{R}_m) partindo da equação (4.6) (IPAC, 2007):

$$\bar{R}_m = \frac{\bar{C}_{\text{obs}}}{C_{\text{MRC}}} \quad (4.6)$$

Em que:

\bar{c}_{obs} – concentração média de uma série de análises do MRC

c_{MRC} – valor certificado do MRC

A incerteza associada à exatidão pode ser calculada através da seguinte expressão (4.7):

$$u(\bar{R}_m) = \bar{R}_m * \sqrt{\left(\frac{s_{obs}^2}{n * \bar{c}_{obs}^2}\right) + \left(\frac{u(c_{MRC})}{c_{MRC}}\right)^2} \quad (4.7)$$

Em que:

s_{obs}^2 – concentração média de uma série de análises do MRC

$u(c_{MRC})$ – incerteza padrão associada ao teor certificado do MRC (referenciada no certificado do MRC)

n – nº de análises do MRC

Desta forma, a incerteza combinada expandida relativa $u(y)$ é determinada a partir da combinação dos valores obtidos para as incertezas associadas à precisão e a exatidão, pela equação (4.8) (IPAC):

$$u(y) = y * \sqrt{(u'_{\text{precisão}})^2 + (u(\bar{R}_m))^2} \quad (4.8)$$

Em que:

y – fator de expansão igual a 2 para intervalo de confiança de 95%.

4. Materiais e Métodos

O procedimento utilizado para a determinação dos teores de carotenoides em produtos hortícolas e em frutos foi previamente validado no INSA (Dias et al., 2008). Este procedimento está acreditado pelo IPAC pela norma *ISO EN 17025* e utiliza um método de cromatografia líquida de alta eficiência.

Com o objectivo de avaliar o efeito da sazonalidade no teor em carotenoides (α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, luteína e zeaxantina) foram analisadas diferentes amostras de frutos (salada de frutas, figos secos, uvas, laranja, maçã, pera, meloa e melão) e de produtos hortícolas (batata, brócolos, tomate, alface, grelos, nabiças, cenouras, couve-flor, pimentos e feijão-verde) recolhidas em diferentes estações do ano, no âmbito do projeto TSDExposure (Total Diet Study, Estudo de Dieta Total). Procedeu-se também à análise de outras amostras, tais como pêssago, banana, ananás, quivi, cogumelos, feijão-verde, feijão frade, passas de uvas e tarte de frutas para a determinação dos seis carotenoides em estudo.

4.1. Reagentes

A água utilizada no procedimento experimental tinha uma pureza de, pelo menos, grau II e foi obtida a partir de um sistema de purificação Mili-Q (Millipore).

- ✓ Acetato de amónio, $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, p.a, pureza $\geq 98\%$, Merck
- ✓ Acetonitrilo (ACN), CH_3CN , para HPLC, pureza $\geq 99,9\%$, VWR Prolabo
- ✓ Azoto, N_2 , com mínimo de pureza 99,9990%
- ✓ Carbonato de magnésio básico, $4\text{MgCO}_3\text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, p.a, Merck,
- ✓ Diclorometano, CH_2Cl_2 , para HPLC, pureza $\geq 99,8\%$, Merck
- ✓ Etanol, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, p.a., pureza $\geq 99,9\%$, Merck
- ✓ Éter de petróleo, p.a, ponto de ebulição $40\text{-}60^\circ\text{C}$, Fischer Chemical
- ✓ Hexano, C_6H_{14} , p.a., pureza $\geq 99,0\%$, Merck
- ✓ Hidróxido de potássio, KOH, lentilhas, p.a., pureza $\geq 85\%$, Prolabo VWR, CAS 1310-58-3
- ✓ Hidroxitolueno butilado (BHT) (2,6-di-ter-butil-4-metilfenol), $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$, p.a., pureza $\geq 98\%$, Panreac Sintesis
- ✓ Metanol (MeOH) CH_3OH , p.a, pureza $\geq 99,8\%$, J.T.Baker
- ✓ Metanol (MeOH) CH_3OH , para HPLC, pureza $\geq 99,9\%$, J.T.Baker

- ✓ Pirogalol (1,2,3,-tri-hidroxibenzeno), $C_6H_6O_3$, p.a., Merck
- ✓ Sulfato de sódio anidro, Na_2SO_4 , p.a, pureza $\geq 99\%$, Merck
- ✓ Tetra-hidrofurano (THF), C_4H_8O , p.a., pureza $\geq 99,9\%$, Merck
- ✓ Trietilamina, $C_6H_{15}N$, p.a, pureza $\geq 99\%$, Merck.
- ✓ Cloreto de sódio (NaCl), p.a, pureza $\geq 99,5\%$, Merck

4.2. Padrões

- ✓ α -Caroteno, β,ϵ -caroteno, pureza (HPLC) $\geq 97\%$, marca: Sigma C-0251, Lote 60H9550
- ✓ β -Caroteno, β,β -caroteno, pureza (HPLC) $\geq 96\%$, marca: Sigma
- ✓ β -Criptoxantina, β,β -caroten-3-ol, pureza (HPLC) $\geq 97\%$, marca: Carote Nature Lote 0055R
- ✓ Licopeno, Ψ,Ψ -caroteno, pureza (HPLC) $\geq 95\%$, marca Biochemica A5311,0005 Lote 07030605
- ✓ Luteína, β,ϵ -caroteno-3,3'-diol, pureza (HPLC) $\geq 96\%$, marca Sigma x-6250 Lote 072K4038
- ✓ Zeaxantina, β,β -caroteno-3,3'-diol, pureza (HPLC) $\geq 97\%$, marca Carote Nature e Lote 0119R
- ✓ β -apo-8'-carotenal, 8'-apo- β -caroten-8'-al, pureza (HPLC) $\geq 97\%$, Sigma
- ✓ Equinenona, β,β -caroten-4-ona, pureza (HPLC) $\geq 98\%$, marca Carote Nature Lote 0283R

4.3. Equipamento

- ✓ Agitador vai-vem horizontal, marca Qlabo, modelo KS-15
- ✓ Aparelho de ultra-sons, marca Branson, modelo 3510 com controlo de tempo e temperatura
- ✓ Balança analítica, marca Mettler Toledo, modelo XP 204, com precisão de 0,0001
- ✓ Bloco de evaporação seco, marca BüChi Vacuum, modelo B-721
- ✓ Bloco de evaporação seco, marca: Barnstead|Thermolyne modelo: Type 28100 Dri-Batch
- ✓ Câmara frigorífica à temperatura de $5^{\circ}C$, ensaiada com registador de temperatura LT172 associado a Pt100's, rastreado à Fluke (EUA), de acordo com ensaio realizado a $5^{\circ}C$ e critério de aceitação $\pm 3^{\circ}C$.
- ✓ Bomba de vácuo, marca: Edwards

- ✓ Centrífuga, marca Eppendorf, modelo centrifuge 5804R
- ✓ Espectrofotómetro, marca Thermo Scientific, modelo Evolution 300 UV-Visible Spectrophotometer equipado com software VISIOpro
- ✓ Evaporador rotativo, marca BüChi, modelo R-210, com ligação ao azoto, com banho de água (B-491) e regulador de temperatura e unidade de vácuo (V-700)
- ✓ Frigorífico de 4°C, marca Miele
- ✓ Homogeneizador, marca IKA yellowline, modelo DI25 basic
- ✓ Moinho de facas (Grindomix), marca Retsch, modelos GM 200
- ✓ Placa de agitação electromagnética, marca Ika Combimag Rct, modelo RCT 87198
- ✓ Sistema de ultrapurificação de água, modelo Milli-Q, marca Millipore
- ✓ Ultracongelador a temperatura de -70°C, marca Revco, ensaiado com registador de temperatura LT211 associado a termopares, rastreado à Fluke (EUA), de acordo com ensaio realizado a -70°C e critério de aceitação $\leq -70^{\circ}\text{C}$.
- ✓ Vortex, marca: Vortex-Genie e modelo K-550-GE
- ✓ Equipamento de HPLC, marca Waters, modelo 717 plus Autosampler, com detetor de rede de díodos (DAD) (Diode Array detector), marca Waters, modelo 2998. Foi utilizado o *software* Empower como sistema de tratamento de dados
- ✓ Coluna analítica Waters Spherisorb ODS2 revestida com PEEK (Altech, cat.no.8161), 100 x 4.6 mm (tamanho de partícula 5 μm , diâmetro de poro 80Å, carga de carbono 12%)
- ✓ Coluna analítica Vydac (cat.No.201TP54) de fase invertida, contendo sílica polimericamente modificada com C18, 250 x 4.6 mm (tamanho de partícula 5 μm , diâmetro de poro 300Å, carga de carbono 8%)

4.4. Soluções

4.4.1. Soluções de trabalho

- ❖ THF:MeOH (1:1) com 0,1% (p/v) de BHT

Mediu-se 1 L de THF e 1 L de MeOH com uma proveta e juntou-se num frasco âmbar. Seguidamente, juntou-se 2 g de BHT e agitou-se numa placa eletromagnética com a ajuda de um agitador magnético até a dissolução completa.

❖ Éter de petróleo com 0,1% (p/v) de BHT

Dissolveu-se 1 g de BHT em 1 L de éter de petróleo num frasco âmbar. Com auxílio de um agitador magnético agitou-se numa placa electromagnética até dissolução completa.

❖ Diclorometano com 0,1% (p/v) de BHT

Dissolveu-se 0,1 g de BHT em diclorometano num balão volumétrico de 100 mL. Completou-se o volume até ao traço com diclorometano.

❖ Solução de KOH em MeOH, a 10% (p/v)

Pesou-se 2 g de KOH para um balão volumétrico de 20 mL. Para dissolver o KOH, adicionou-se 3 mL de água desionizada e encheu-se até a marca com MeOH.

❖ Solução de pirogalol em MeOH

Pesou-se 80 mg de pirogalol para um balão volumétrico de 20 ml e dissolveu-se em MeOH. Completou-se o volume até a marca com MeOH.

❖ Solução de NaCl a 10% (p/v)

Pesou-se 200g de NaCl para um frasco âmbar e dissolveu-se em 2 L de água. Agitou-se numa placa eletromagnética com a ajuda de um agitador magnético até a dissolução completa.

4.4.2. Fase móvel para HPLC

❖ Eluente A: Acetonitrilo

❖ Eluente B

Dissolveu-se 7,7 g de acetato de amónio em 2 L de MeOH com a ajuda de um agitador magnético numa placa de agitação electromagnética. De seguida, adicionou-se 500 mL de diclorometano, 5 mL de trietilamina, 10 g de BHT e voltou-se novamente a agitar. Por fim, filtrou-se através de um filtro de membrana de 0,45 µm, apropriado para solventes orgânicos e desgaseificou-se no aparelho de ultra-sons durante 15 minutos.

❖ Fase móvel sem diclorometano

Mediu-se 670 mL de acetonitrilo e 230 mL de MeOH para um frasco âmbar. De seguida, adicionou-se 0,9 g de BHT e agitou-se. Filtrou-se através de um filtro de membrana de 0,45 µm, apropriado para solventes orgânicos.

4.4.3. Soluções de padrões internos

❖ β-apo-8'-carotenal

Pesou-se 2 mg do padrão para um balão de 50 mL e completou-se com diclorometano contendo 0,1% de BHT.

❖ Equinenona

Pesou-se 2 mg do padrão para um balão de 50 mL e completou-se a solução com diclorometano contendo 0,1% de BHT.

4.4.4. Soluções de padrões externos

❖ Soluções mãe individuais de cada carotenoide

Dissolveu-se o conteúdo de cada ampola de carotenoide (α-caroteno, β-caroteno, β-criptoxantina, licopeno, luteína, zeaxantina) em diferentes balões volumétricos utilizando diclorometano contendo 0,1% de BHT. Para ampolas de 1 mg de carotenoide utilizou-se balões volumétricos de 10 mL e para ampolas de 5 mg, balões volumétricos de 50 mL.

❖ Soluções padrão de cada carotenoide para determinação espectrofotométrica do teor

Mediu-se 0,2 mL da solução mãe de cada carotenoide para balões volumétricos de 10 mL e evaporou-se o solvente com azoto. De seguida, reconstituiu-se em 10 mL de hexano para o α-caroteno, β-caroteno, β-criptoxantina, licopeno e em 10 mL de etanol para a luteína e zeaxantina. Mediu-se as absorvâncias das soluções no espectrofotómetro em células de quartzo de 1 cm de percurso óptico aos comprimentos de onda referidos na tabela 4.1.

Tabela 4.1-Coeficientes de extinção (ϵ) e comprimentos de onda de absorção máxima (λ) dos carotenoides (DAN, 2012).

Padrão	Solvente	$\lambda(nm)$	$\epsilon_{1cm}^{1\%}$
α-Caroteno	Hexano	444	2800
β-Caroteno	Hexano	450	2560
Licopeno	Hexano	472	3450
β -Criptoxantina	Hexano	451	2460
Luteína	Etanol	445	2550
Zeaxantina	Etanol	450	2540

Calculou-se o teor dos padrões recorrendo à Lei de Beer-Lambert, através da equação (4.1):

$$C_p = \frac{A \times 10^4}{\epsilon_{1cm}^{1\%}} \quad (4.1)$$

Em que:

C_p é o teor do padrão em $\mu g/mL$

A é a absorvância

$\epsilon_{1cm}^{1\%}$ é o coeficiente de extinção ou coeficiente de absorção (absorvância de uma solução com um teor de 1 g/100 mL medida numa célula de percurso óptico- 1cm).

❖ Soluções padrão de cada carotenoide para determinação da pureza por HPLC

Pipetou-se 0,2 ml de cada uma das soluções mãe para 6 balões de 10 mL e completou-se o volume com fase móvel sem diclorometano. O valor da pureza de cada um dos padrões é posteriormente utilizado para determinar a concentração real dos padrões que se encontra presente em cada solução padrão de trabalho.

❖ Soluções padrão de trabalho (curva de calibração)

Preparou-se 6 soluções padrão de trabalho sendo cada uma delas constituída pela mistura dos diferentes padrões. As diluições foram feitas conforme a tabela 4.2 e completou-se o volume com fase móvel sem diclorometano.

Tabela 4.2-Soluções padrão de trabalho.

<i>Nível da sol. padrão</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
Vol. sol. mãe (mL)	--	0,25	0,20	0,30	0,40	0,50
Vol. sol. nível 6 (mL)	0,25	--	--	--	--	--
Volume balão (mL)	10	25	10	10	10	10

4.5. Procedimento experimental

Os analitos (α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, luteína, zeaxantina) presentes nas várias matrizes alimentares foram extraídos com THF e MeOH. Os extratos provenientes de matrizes que continham ésteres dos analitos foram em seguida saponificados para obter os carotenoides na forma livre. A separação e a análise foram feitas por HPLC em fase invertida, com detecção no UV/Visível a um comprimento de onda de 473 nm para o licopeno e 450 nm para os restantes carotenoides. A identificação e quantificação foram feitas recorrendo a padrões externos.

Para o cálculo dos resultados finais utilizou-se folhas de cálculo previamente validadas, como a apresentada no Anexo 4, bem como retas de calibração que foram construídas para cada um dos seis carotenoides, onde as concentrações das soluções padrão foram calculadas com base nas medidas de absorvância feitas para cada analito, como a apresentada no Anexo 5.

Todos os resultados obtidos foram corrigidos considerando a recuperação de um padrão interno (equinenona no caso dos legumes verdes e pimentos e β -apo-8'-carotenal nos restantes casos), adicionado no início do processo de extração.

4.5.1. Identificação das amostras

Analisaram-se várias amostras de alimentos que fazem parte da alimentação da população portuguesa tais como: frutos (laranja, pêssago, banana, ananas, uvas, kiwi,

salada de frutas, maçã, pera, figos, meloa, melão), produtos hortícolas (batata, brócolos, tomate, alface, grelos, nabiças, cenouras, couve-flor, pimentos, feijão verde, cogumelos), passas de uvas, tartes de frutas com frutos secos, feijão-frade e outras variedades de feijão (mistura de encarnado, branco, manteiga e preto).

As amostras foram adquiridas em supermercados e hipermercados da região da grande Lisboa no âmbito do projeto TDSExposure. Com vista ao estudo do efeito da sazonalidade, algumas amostras foram recolhidas em diferentes estações do ano.

As amostras já se encontravam preparadas no laboratório. No entanto, é importante referir que cada amostra foi preparada a partir de 12 sub-amostras para ser representativa de cada um dos alimentos em análise. As amostras sólidas foram trituradas e homogeneizadas no moinho e sujeitas a processos de extração e, quando necessário, submetidas a saponificação.

4.5.2. Extração

Num erlenmeyer de 100 mL, pesou-se cada amostra numa balança analítica. A massa das amostras variou entre 2 e 20 g consoante o conteúdo em carotenoides que era esperado.

Adicionou-se 1 g de carbonato de magnésio e de seguida adicionou-se 50 ml da mistura de THF:MeOH (1:1) com 0,1% de BHT.

Juntou-se 0,2 mL de solução de padrão interno (equinenona no caso de legumes verdes e pimentos e β -apo-8'-carotenal nos restantes casos). Paralelamente também foi analisado o padrão interno na mesma concentração em que foi adicionado às amostras. A mistura foi colocada no homogeneizador, a 19000 rpm durante 1 min.

Filtrou-se a suspensão obtida através de um filtro de fibra de vidro, utilizando um Kitasato sob vácuo com o respetivo funil de Büchner. Lavou-se o homogeneizador e o erlenmeyer com mais 50 mL da mistura de THF:MeOH (1:1) e filtrou-se. Lavou-se o bolo de filtração com mais 2x50 mL da mistura de THF:MeOH (1:1).

Seguidamente, numa ampola de decantação procedeu-se a uma extração líquido-líquido com éter de petróleo onde ocorreu a passagem dos analitos para a fase superior.

Transferiu-se os extratos combinados correspondentes a cada amostra para uma pera de evaporação e evaporou-se o solvente num evaporador rotativo.

Reconstituiu-se o resíduo sólido em 0,5 mL de diclorometano e 4,5 mL de fase móvel sem diclorometano.

Filtrou-se através de filtros de seringa 0,45 μ m e transferiu-se para frascinhos apropriados para análise no HPLC.

4.5.3. Saponificação

Foi necessário fazer a saponificação de algumas das soluções obtidas anteriormente, para a determinação de carotenoides que se encontrem nas formas esterificadas ou para a determinação de carotenoides em amostras que continham gordura. As amostras saponificadas foram as de pêssago, banana, ananás, laranja, uvas, kiwi, salada de frutas, maçã, pera, figos secos, batata, meloa e melão.

Para estas amostras, transferiu-se 2,0 mL da solução reconstituída obtida anteriormente resultante da extração dos analitos para tubos de vidro roscados, seguidamente colocou-se sobre azoto e guardou-se até ao dia seguinte à temperatura de $5\pm 3^{\circ}\text{C}$.

No dia seguinte, evaporou-se o conteúdo dos tubos de vidro roscados até à secura utilizando o bloco de evaporação.

Adicionou-se 0,75 mL da solução de pirogallol e de seguida 0,75 mL de solução de KOH. Purgou-se o ar do interior dos tubos por varrimento com azoto e misturou-se no vórtex até a dissolução completa do resíduo.

No agitador vai-vem colocou-se os tubos na horizontal a 250 rpm durante 1 a 3 h, dependendo do tipo de amostra a analisar.

Seguidamente, adicionou-se 1,5 mL de água, purgou-se com azoto e misturou-se no vórtex. Adicionou-se 3 mL de éter de petróleo e purgou-se com azoto.

Agitou-se novamente os tubos no agitador vai-vem horizontal a 250 rpm durante 5 min e de seguida centrifugou-se durante 2 min a 2000 rpm.

Transferiu-se a fase superior com a ajuda de uma pipeta de Pasteur de vidro para um tubo de vidro limpo. Repetiu-se a extração mais duas vezes com éter de petróleo.

Colocaram-se as fases superiores num bloco de evaporação para evaporação do solvente sob azoto.

Por último, reconstitui-se em 0,2 mL de diclorometano e 1,8 mL de fase móvel sem diclorometano. Transferiu-se com uma pipeta de Pasteur de vidro para frasquinhos apropriados para análise no HPLC.

4.5.4. Condições cromatográficas

As condições utilizadas na análise cromatográfica pela técnica de (HPLC) encontram-se representadas na tabela 4.3.

Tabela 4.3-Condições cromatográficas utilizadas na análise por HPLC.

Parâmetros	Condições
Modo de eluição	Em gradiente segundo a tabela 4.4
Caudal	1,5 mL /min
Volume de injeção	50 µL
Deteção	473 nm licopeno 450 nm restantes carotenoides
Temperatura	21°C
Tempo de corrida	Cerca de 35 min

Na tabela 4.4 apresentam-se as condições aplicadas no modo de eluição em gradiente.

Tabela 4.4-Condições aplicadas no modo de eluição em gradiente.

<i>Tempo (min)</i>	<i>%Eluente A</i>	<i>%Eluente B</i>
0	67	33
14	67	33
17	75	25
30	75	25
33	72	28
34,5	67	33

4.5.5. Identificação dos analitos

Os analitos foram identificados pela comparação dos seus tempos de retenção com os dos respetivos padrões. Para além disso procedeu-se à confirmação da identidade dos analitos por comparação do espectro de cada analito na amostra com o do padrão.

4.5.6. Quantificação dos analitos

A quantificação dos analitos foi obtida a partir do método do padrão externo utilizando uma curva de calibração que relaciona a concentração das soluções padrão com as áreas dos respectivos picos.

O software “Empower” integrado no sistema de HPLC “Waters” permitiu calcular o teor dos carotenoides presentes na amostra recorrendo as curvas de calibração construídas para o efeito (Anexo 4).

O teor do analito nas amostras (C em mg/100 g) foi calculado através da seguinte expressão (4.2):

$$C=10\frac{C_{si}V_f}{mRd} \quad (4.2)$$

Onde:

10 é um fator de conversão de unidades (conversão ug/g para mg/100 g)

C_{si} é o teor do analito na solução de amostra que foi analisada ($\mu\text{g/mL}$)

V_f é o volume final em que se reconstituiu a amostra (mL)

m é a massa da toma de amostra (g)

R é a recuperação do padrão interno (%)

d é a diluição efetuada na solução de amostra após reconstituição

De forma a avaliar o rendimento do procedimento analítico, foi determinada para cada amostra a recuperação do padrão interno (R). Esta recuperação foi calculada através da razão entre a área do pico de padrão interno na solução da amostra e na solução de padrão interno individual. Para a comparação dos valores, utilizou-se o padrão em igual concentração nas duas soluções.

O método analítico utilizado no laboratório do INSA para a determinação de carotenoides em frutos e produtos hortícolas encontra-se acreditado pela norma ISO EN 17025, avaliando os seguintes parâmetros: linearidade (0,05-5,0 $\mu\text{g/mL}$, $r^2 \geq 0,995$); sensibilidade ($34\text{-}51 \times 10^4$ AUxminx/mL/ μg); precisão intermédia – 5,3-18%, sem saponificação – 2,1-12%; recuperação com saponificação (65% a 85%) e sem saponificação (83% a 102%); limite de detecção – 12-18 pg/mL (0,58-0,92 $\mu\text{g}/100$ g) e limite de quantificação – 35-55 pg/mL (1,8-2,8 $\mu\text{g}/100$ g) (Dias et al., 2008).

4.6. Utilização do material de referência interno

Neste trabalho, utilizou-se um material de referência (MR) interno à base de cenoura, brócolos, pêsego e tomate desenvolvido por Silva (2014) para permitir um melhor controlo dos resultados obtidos, isto é, da precisão dos resultados obtidos no Laboratório, funcionando como uma amostra de controlo da qualidade.

Para a uma melhor visualização do controlo contínuo sobre os resultados produzidos e consequentemente melhor deteção de erro, recorreu-se ao emprego das cartas de controlo de médias.

Para a construção da carta de controlo de médias, foi necessário calcular a linha central correspondente ao valor médio (\bar{x}), as linhas de aviso ($\bar{x} \pm 2s$) e as linhas de controlo ($\bar{x} \pm 3s$). O valor médio e o desvio padrão foram os obtidos nas dozes sub-amostras deste material que foram preparadas e analisadas por Silva (2014).

No anexo 6 apresentam-se os valores médios e o desvio-padrão calculados que foram utilizados para a construção das cartas de controlo bem como os respectivos valores das linhas de aviso ($\bar{x} \pm 2s$) e as linhas de controlo($\bar{x} \pm 3s$) para cada carotenoide.

4.7. Diferença Mínima Significativa (DMS)

Neste trabalho, recorreu-se à determinação da Diferença Mínima Significativa (DMS) para a avaliação das diferenças entre os teores de carotenoides nas amostras, em particular nos estudos da sazonalidade.

A diferença mínima significativa (DMS) pode ser determinada pela equação (4.3):

$$DMS = ts \sqrt{\frac{2}{n}} \quad (4.3)$$

Em que:

s - desvio padrão

t - valor obtido a partir da distribuição t com um intervalo confiança de 95% para os graus de liberdade de s

n - número de amostras

Para avaliar a diferença nos teores de carotenoides em amostras recolhidas em diferentes estações do ano, substituiu-se $\frac{ts}{\sqrt{n}}$ pelo valor médio da incerteza combinada expandida

da medição para um nível de significância de 5% (Dias et al., 2009). A incerteza expandida relativa representa o produto da incerteza combinada pelo fator de expansão. Para uma distribuição normal, frequentemente assume-se 95% de probabilidade, a que corresponde um fator de expansão de “2” (Cruz, 2004).

A incerteza dos resultados das medições foi previamente avaliada recorrendo a diversas matrizes de produtos hortícolas e de frutos que resultaram de trabalhos realizados anteriormente no Laboratório de Química do INSA. Assim, a incerteza expandida (fator de cobertura (de 95%) relativa de cada carotenoide foi de:

- ✓ 31%- α -caroteno
- ✓ 30%- β -caroteno
- ✓ 27%-licopeno
- ✓ 37%-luteína
- ✓ 40%-zeaxantina
- ✓ 29%- β -criptoxantina

A avaliação das diferenças entre os teores de carotenoides nas amostras recolhidas em diferentes estações do ano foi determinada pela comparação do valor da DMS, obtido a partir do valor médio da incerteza expandida de cada carotenoide, com a diferença entre os teores de carotenoides em duas estações do ano. Desta forma, se a DMS for maior que a diferença entre os teores de carotenoides em duas estações do ano, significa que existem diferenças significativas, caso contrário, se a DMS for inferior significa que não existem diferenças significativas sendo os teores semelhantes.

5. Resultados e Discussão

Como já foi referido anteriormente neste trabalho, para a determinação de carotenoides nos frutos e produtos hortícolas pela técnica de HPLC, foi utilizado o procedimento validado no INSA que está acreditado pelo IPAC pela norma ISO EN 17025 (Dias et al., 2008).

A título exemplificativo, apresenta-se na figura 5.1 um cromatograma relativo à análise de uma amostra (salada de frutas) contendo os seis carotenoides em estudo.

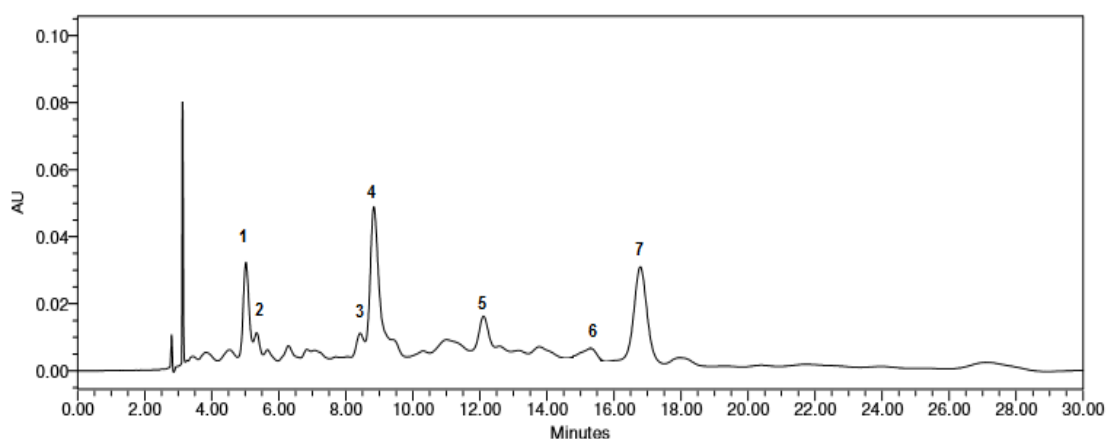


Figura 5.1- Cromatograma da amostra de salada de frutas contendo 1 - luteína ($t_r=5,019$ min), 2 - zeaxantina ($t_r=5,340$ min), 3 – β -criptoxantina ($t_r=8,426$ min), 4 – equinenona ($t_r= 8,836$ min), 5 - licopeno ($t_r=12,110$ min), 6 – α -caroteno ($t_r=15,310$ min) e 7- β -caroteno ($t_r=16,783$ min).

No método analítico utilizado a quantificação dos analitos foi feita por calibração externa, corrigindo-se os resultados com a recuperação do padrão interno. As taxas de recuperação variaram entre 60% e 120% nas amostras que não requereram saponificação, e entre 40% e 60% para as que foram saponificadas, isto é, de uma forma geral a saponificação reduz a recuperação do padrão interno e por isso poderá destruir uma parte dos carotenoides, só devendo ser realizada quando for estritamente necessária.

Para o estudo do efeito da sazonalidade, utilizou-se a Diferença Mínima Significativa (DMS) para a avaliação das diferenças entre os teores de carotenoides nas amostras ao longo do ano. Esta foi calculada a partir de incerteza expandida da medição para um nível de significância de 5% (Dias et al., 2009) de acordo com os referidos no ponto 4.7. Nos anexos 7 e 8 , apresenta-se a DMS calculada para cada um dos carotenoides nas amostras de frutas e produtos hortícolas analisadas sob o ponto de vista da sazonalidade.

No sentido de avaliar se a época considerada ideal para o consumo dos frutos e produtos hortícolas em Portugal coincide com o período em que estes produtos apresentam o teor total em carotenoides mais elevado, foi consultado o documento que é apresentado no Anexo 2.

5.1. Análise do Material de referência interno

No decorrer deste trabalho, foram analisadas cinco amostras do material de referência interno para o controlo da qualidade interna. A título exemplificativo, apresenta-se no anexo 9 um cromatograma relativo à análise do material de referência interno.

Os valores médios do teor em carotenoides obtidos para cada amostra de material de referência interno analisada encontram-se representados na tabela 5.1.

Tabela 5.1- Teores dos carotenoides nas amostras do MR interno (mg/100 g).

Amostras	α -caroteno	β -caroteno	Licopeno	Luteína	Zeaxantina	β -criptoxantina
MR interno	0,2473	0,6814	3,3077	0,0631	0,0355	0,0992
	0,1922	0,5549	2,9115	0,0700	0,0462	0,1129
	0,2678	0,7090	1,3799	0,0701	0,0472	0,1463
	0,2835	0,7086	1,7707	0,0714	0,0372	---
	0,2334	0,7744	2,0594	0,0682	0,0463	---

5.1.1. Carta de Controlo de médias

As cartas de controlo permitem o controlo da qualidade de resultados através de uma representação gráfica. A utilização das cartas de controlo é um dos meios mais eficientes de detectar erros e de exercer e visualizar um controlo contínuo sobre os resultados produzidos.

Nas figuras que se seguem (Figuras 5.2 a 5.7), apresentam-se as cartas de controlo de médias construídas para os seis carotenoides em estudo.

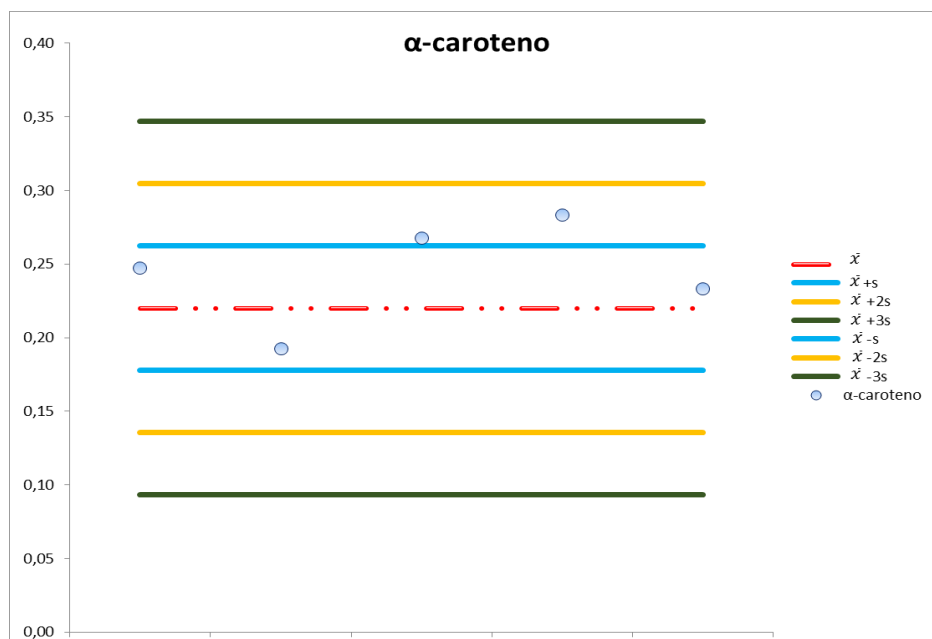


Figura 5.2- Carta de controlo de médias para o α-caroteno.

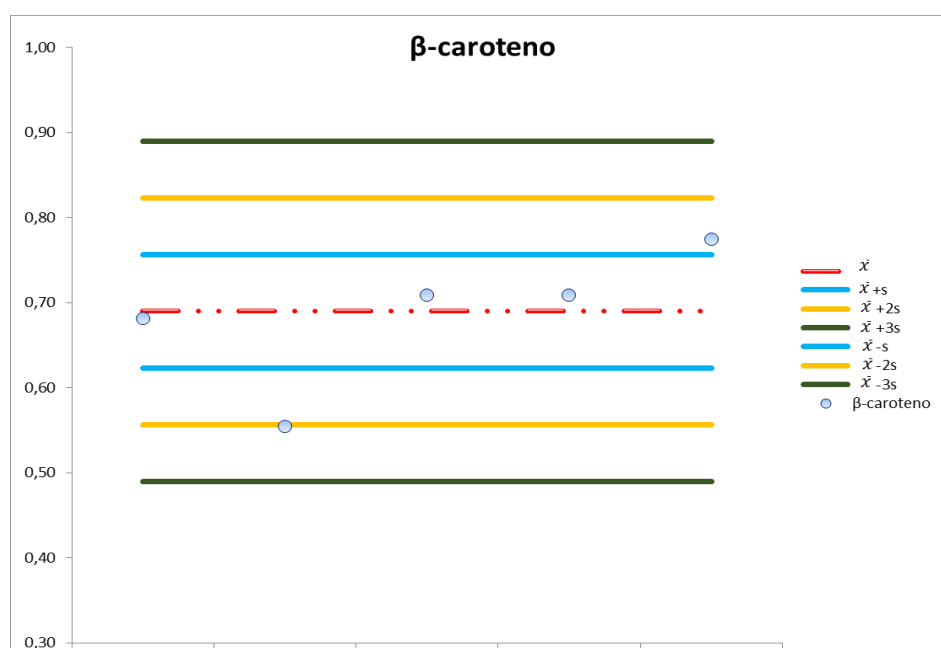


Figura 5.3 - Carta de controlo de médias para o β-caroteno.

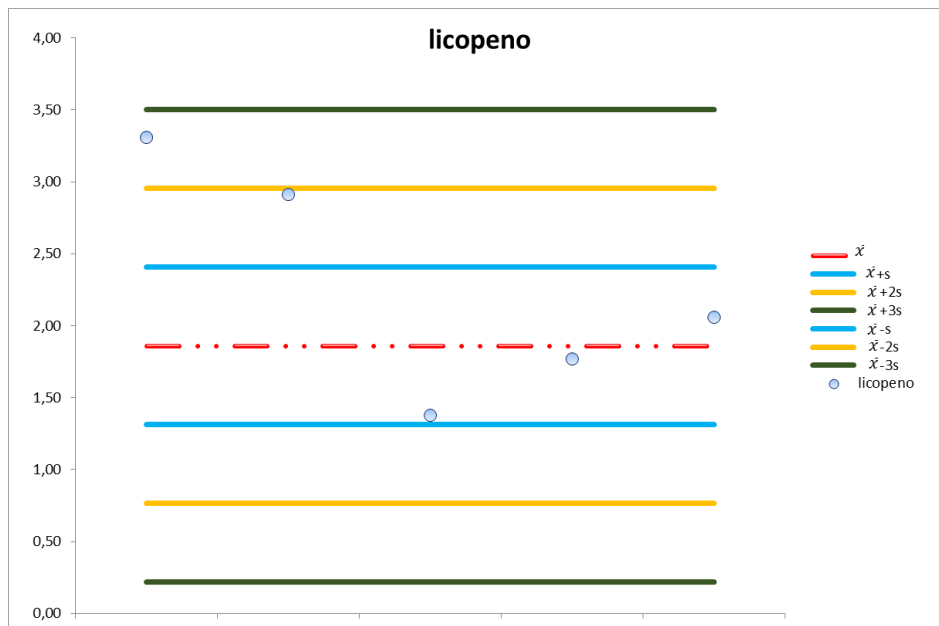


Figura 5.4 - Carta de controlo de médias para o licopeno.

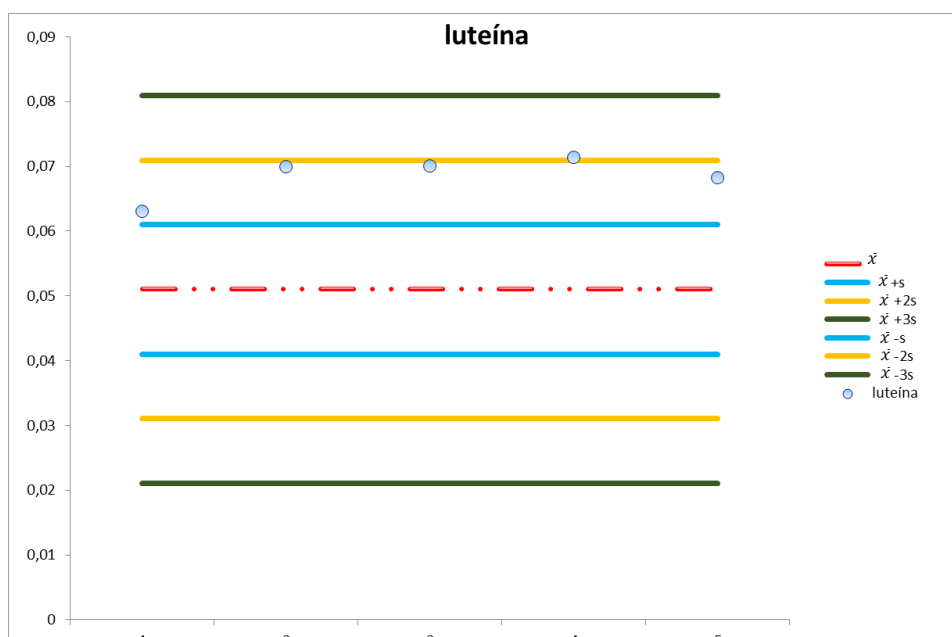


Figura 5.5 - Carta de controlo de médias para a luteína.

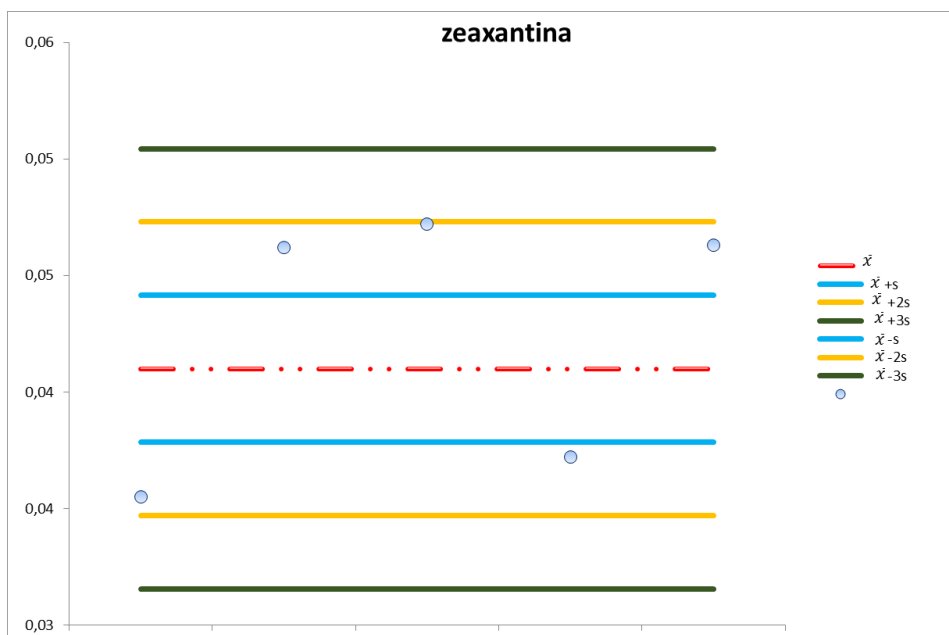


Figura 5.6 – Carta de controlo de médias para a zeaxantina.

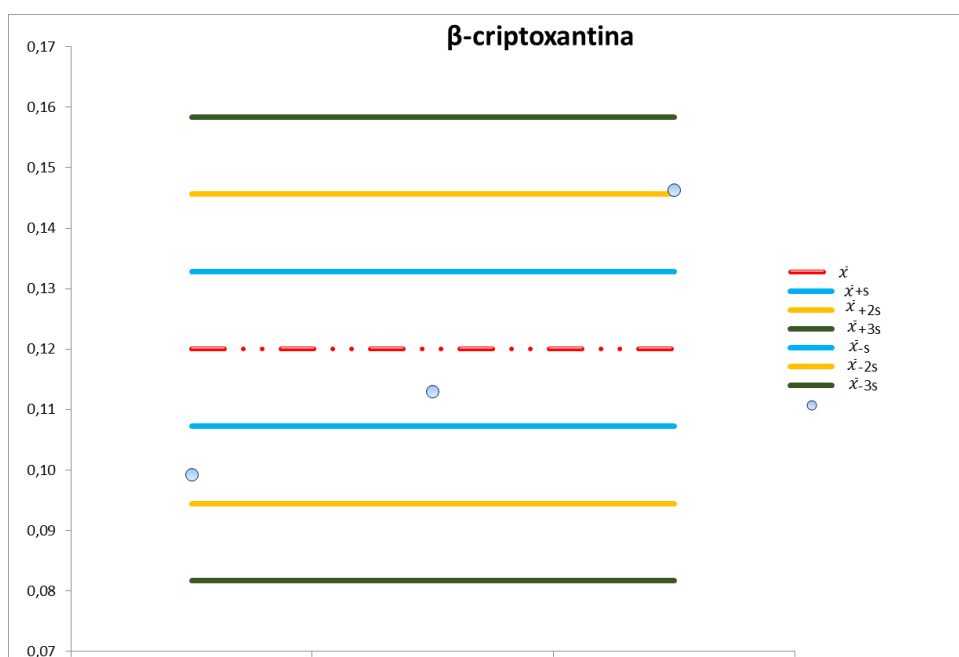


Figura 5.7- Carta de controlo de médias para a β-criptoxantina.

Pela observação dos gráficos da figura 5.2 a 5.3 é possível verificar que para as cinco amostras de material de referência interno analisadas, os teroeos em α -caroteno, β -caroteno e licopeno encontram-se dentro das linhas de aviso ($\bar{x} \pm 2s$) significando que 95% dos valores encontram-se dentro do intervalo de dois desvios padrão. De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que o método analítico nas condições

utilizadas no laboratório teve um bom desempenho na análise do α -caroteno, β -caroteno e licopeno.

Na figura 5.4 é possível verificar que para as cinco amostras de material de referência interno analisadas, os teores em licopeno encontram-se dentro das linhas de aviso ($\bar{x} \pm 2s$) para quatro amostras e uma encontrava-se entre a linhas de aviso ($\bar{x} \pm 2s$) e a linha de controlo ($\bar{x} \pm 3s$). Pela observação dos gráficos da figura 5.5 e 5.6 é possível verificar que para as cinco amostras de material de referência interno analisadas, os teores em luteína e zeaxantina se encontravam dentro das linhas de aviso ($\bar{x} \pm 2s$) significando que 95% dos valores se encontram dentro do intervalo de dois desvios padrão. Para a figura 5.7, apenas foram considerados os resultados obtidos na análise de três amostras do material de referência interno. Pela observação da figura, verifica-se que 95% dos valores encontram-se dentro do intervalo de dois desvios padrão.

De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que o método analítico nas condições utilizadas no laboratório teve um bom desempenho.

5.2. Carotenoides em amostras de frutos avaliados sob o ponto de vista da sazonalidade

Conforme já foi referido no Capítulo 4 - Materiais e Métodos, foram analisadas diversas amostras de frutos (salada de frutas, figos secos, uvas, laranja, maçã, pera, meloa e melão) recolhidas em diferentes estações do ano (verão, outono e inverno) no âmbito do projeto TSDExposure (Total Diet Study, Estudo de Dieta Total) com vista à determinação do seu conteúdo em carotenoides e ao estudo da influência da sazonalidade. Para as matrizes meloa e melão, estudou-se apenas a influência da sazonalidade para duas estações do ano (primavera e verão).

Os resultados obtidos para as amostras de salada de frutas, figos secos, uvas, laranja, maçã e pera para a estação do ano primavera não foram obtidos no âmbito desta tese, mas por Silva (2014). A sua apresentação nesta tese tem como finalidade fazer o estudo comparativo entre as quatro estações do ano.

5.2.1. Influência da sazonalidade

Os teores em carotenoides obtidos a partir da análise de amostras de frutos recolhidas em diferentes estações do ano, encontram-se referidos na Tabela 5.2.

Tabela 5.2- Teores de carotenoides nas amostras de frutos analisadas para o estudo do efeito da sazonalidade.

Amostra	Estação	Teor (mg/100 g)*						
		α -caroteno	β -caroteno	Licopeno	Luteína	Zeaxantina	β -criptoxantina	C.Totais (mg/100g)**
Salada de Frutas	Primavera #	0,019 ^c	0,089 ^c	0,014 ^a	0,033 ^b	0,020 ^a	0,013 ^c	0,19
	Verão	0,0052 ^a	0,020 ^b	0,10 ^b	0,02 ^a	0,01 ^b	0,04 ^a	0,19
	Outono	0,0023 ^b	0,044 ^a	0,18 ^c	0,031 ^{ab}	0,02 ^{ab}	0,030 ^{ab}	0,30
	Inverno	0,0051 ^a	0,040 ^a	0,026 ^a	0,033 ^b	0,014 ^b	0,025 ^b	0,14
Uvas	Primavera #	ND	0,027 ^a	ND	0,038 ^a	0,0054 ^a	ND	0,07
	Verão	ND	0,026 ^a	ND	0,057 ^b	0,0051 ^a	ND	0,09
	Outono	ND	0,0200 ^a	ND	0,022 ^c	ND	ND	0,04
	Inverno	ND	0,026 ^a	ND	0,047 ^{ab}	0,0036 ^a	ND	0,08
Laranja	Primavera #	ND	0,060 ^c	ND	0,024 ^b	0,055 ^a	0,056 ^a	0,20
	Verão	0,0084	0,037 ^b	ND	0,013 ^a	0,048 ^a	0,034 ^b	0,14
	Outono	ND	0,0072 ^a	ND	0,014 ^a	0,019 ^b	0,035 ^b	0,08
	Inverno	ND	0,014 ^a	ND	0,0069 ^c	0,021 ^b	0,049 ^a	0,09
Maça	Primavera #	ND	0,022 ^a	ND	0,0067 ^a	0,0058 ^a	0,0038 ^{ab}	0,04
	Verão	(0,0011)	0,015 ^b	ND	0,022 ^b	0,0028 ^b	0,0062 ^c	0,05
	Outono	ND	0,023 ^a	ND	0,024 ^b	0,0032 ^b	0,0048 ^a	0,06
	Inverno	ND	0,0041 ^c	ND	0,018 ^b	0,0034 ^b	0,0027 ^b	0,03
Pêra	Primavera #	ND	(0,0016)	ND	0,0098 ^b	0,0063 ^a	ND	0,02
	Verão	ND	ND	ND	0,0097 ^b	0,0026 ^b	ND	0,01
	Outono	ND	ND	ND	0,011 ^b	0,0029 ^b	ND	0,01
	Inverno	ND	ND	ND	0,014 ^a	0,0049 ^a	ND	0,02
Figos secos	Primavera #	ND	0,019 ^b	ND	0,022 ^a	0,040 ^a	ND	0,08
	Verão	ND	(0,0012)	ND	0,0088 ^b	0,0083 ^b	0,0032 ^a	0,02
	Outono	ND	(0,0014)	0,0038 ^a	0,014 ^b	0,0090 ^b	0,0037 ^a	0,03
	Inverno	ND	0,0080 ^a	0,014 ^b	0,0088 ^b	0,0095 ^b	0,0032 ^a	0,04
Melo	Primavera	ND	0,38 ^a	ND	0,041 ^a	ND	ND	0,42
	Verão	ND	0,099 ^b	ND	0,041 ^a	ND	ND	0,14
Melão	Primavera	ND	0,0086 ^a	ND	0,011 ^a	ND	ND	0,02
	Verão	ND	0,050 ^b	ND	0,025 ^b	ND	ND	0,07

ND-Não detetado (limites de deteção em mg/100g: α -Caroteno-0,0009, β -Caroteno-0,001, Licopeno-0,0008, Luteína-0,0007, Zeaxantina-0,0008 e β -Criptoxantina-0,0006)

() – Entre o limite de deteção e o limite de quantificação (limites de quantificação em mg/100 g: α -caroteno-0,002, β -caroteno-0,003, licopeno-0,003, luteína-0,002, zeaxantina-0,002 e β -criptoxantina-0,002)

* – Para cada tipo de amostra resultados que apresentem letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$)

– Silva (2014).

** - Carotenoides Totais

Com base nos resultados obtidos para todas as amostras de frutos (Tabela 5.2), foi possível verificar que os carotenoides presentes na maior parte das matrizes alimentares são o β -caroteno (em pelo menos 67% das amostras), zeaxantina (em pelo menos 75% das amostras) e a luteína que se encontra presente em todas as amostras analisadas.

A amostra de salada de frutas foi a que apresentou maior teor de α -caroteno (0,019 mg/100 g), β -caroteno (0,089 mg/100 g) e também licopeno (0,18 mg/100 g).

O maior teor de luteína foi encontrado na amostra de uvas (0,057 mg/100 g). A amostra de laranja foi a que apresentou um teor mais elevado de zeaxantina (0,055 mg/100 g) e β -criptoxantina (0,056 mg/100 g).

A amostra de salada de fruta foi a que apresentou um teor total de carotenoides superior. Este resultado poderá estar relacionado com o facto de as saladas de frutas conterem frutos tropicais, nomeadamente manga e papaia, que são frutos tropicais muito ricos nesses produtos.

Para uma discussão mais pormenorizada sobre a composição de carotenoides de cada uma das amostras, apresentam-se os resultados em gráficos de barras de forma a facilitar a sua comparação.

- Salada de frutas

Pela figura 5.8 é possível verificar que todos os carotenoides estavam presentes nas amostras de salada de frutas, sendo a única amostra para a qual foi possível identificar e quantificar todos os carotenoides em estudo. O α -caroteno é o carotenoide que se apresenta em menor quantidade no verão, outono e inverno. Com base na DMS calculada para cada um dos carotenoides nas amostras de salada de frutas analisadas, os resultados sugerem que as saladas de fruta no verão e no outono têm, relativamente às outras estações do ano, quantidades mais elevadas de licopeno e na primavera teores mais elevados de β -caroteno. O teor em β -caroteno é semelhante nas amostras recolhidas na estação de inverno e outono. O teor em licopeno é semelhante nas amostras recolhidas na estação de primavera e inverno. Os teores em α -caroteno e zeaxantina são semelhantes nas amostras recolhidas na estação de verão e inverno. Os teores em luteína e β -criptoxantina na amostra recolhida na estação do outono são semelhantes aos da estação de verão e inverno.

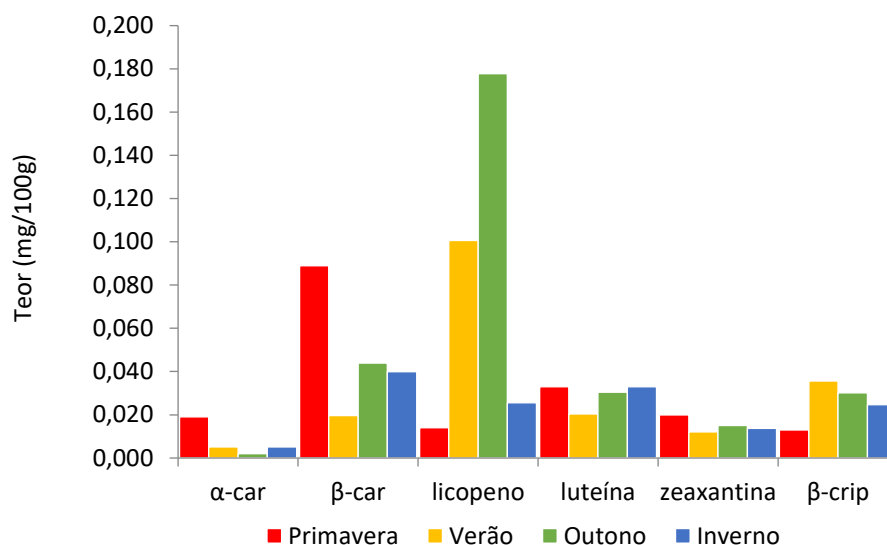


Figura 5.8- Teor de carotenoides nas amostras de salada de frutas nas quatro estações do ano.

- Uvas

Quanto às uvas, conforme a Figura 5.9, apenas foi possível quantificar β-caroteno, luteína e zeaxantina, sendo que, na amostra recolhida no outono, não foi detetada zeaxantina. A luteína é o carotenoide preponderante nas uvas em qualquer uma das estações do ano sendo a amostra recolhida no verão a que apresentou o teor mais elevado. Os resultados obtidos sugerem que o teor total em carotenoides não varia muito ao longo do ano embora seja superior no verão, época em que também se recomenda o consumo deste tipo de fruta em Portugal (Anexo 2).

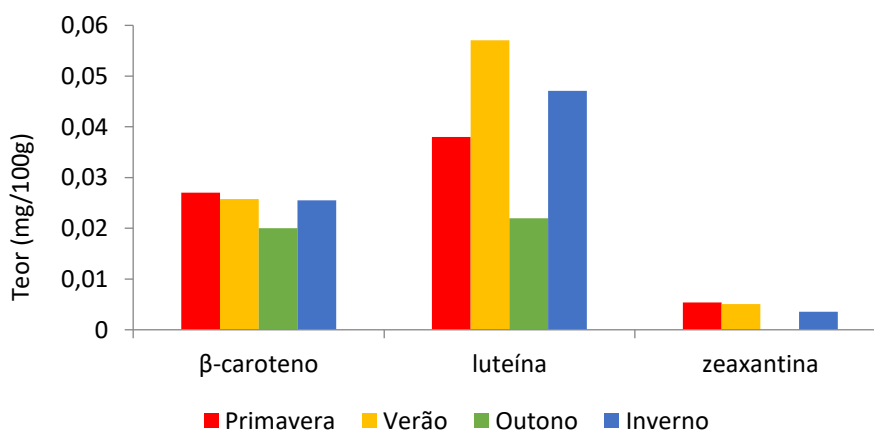


Figura 5.9- Teor de carotenoides em uvas nas quatro estações do ano.

De acordo com a DMS é de notar que o teor em β -caroteno é semelhante nas quatro estações do ano; o teor em luteína é semelhante nas estações da primavera e inverno e nas do verão e outono; o teor em zeaxantina é semelhante nas estações do ano em que foi detetada.

A avaliação do efeito da sazonalidade nas amostras de uvas revelou que existe diferenças significativas no teor em luteína ao longo do ano ao contrário dos teores em β -caroteno e zeaxantina que se mantêm semelhantes.

- Laranjas

No que se refere às laranjas, conforme a Figura 5.10, na análise efetuada foram quantificados os seguintes carotenoides: β -caroteno, luteína, zeaxantina e β -criptoxantina. Apenas a amostra recolhida no verão revelou a presença de α -caroteno embora numa situação minoritária em relação aos outros carotenoides. Considerando as quatro estações do ano, as laranjas recolhidas na primavera apresentaram um teor total em carotenoides significativamente superior. Os resultados obtidos sugerem, assim, um teor de carotenoides superior na primavera, estação do ano que também se recomenda o consumo desta fruta em Portugal (Anexo 2).

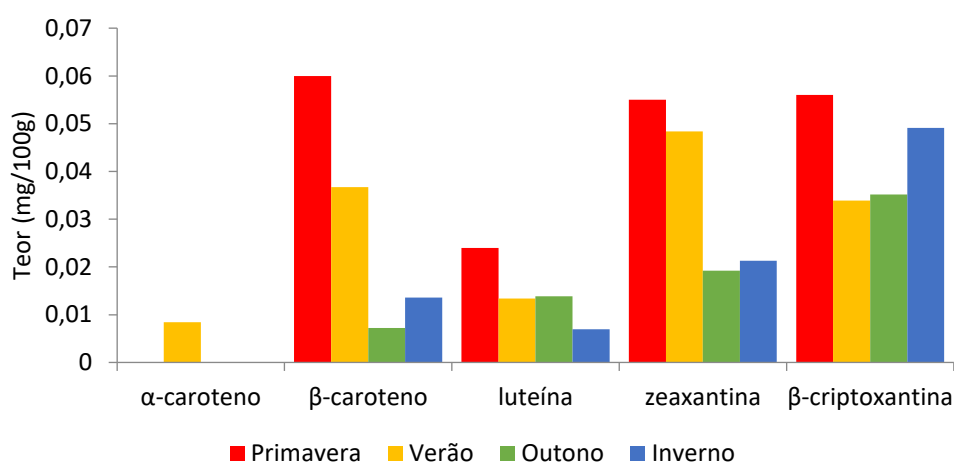


Figura 5.10- Teor de carotenoides em laranjas nas quatro estações do ano.

Com base na DMS verifica-se que:

- O teor em β -caroteno nas laranjas foi semelhante na estação de inverno e outono.
- O teor em zeaxantina foi semelhante nas amostras de primavera e verão e superior ao determinado no inverno e outono, que são aproximadamente semelhantes.

- O teor em β -criptoxantina foi semelhante na estação primavera e inverno e superior ao teor no verão e outono, sendo que estes não diferem significativamente.

- Maçã

Quanto à maçã e como se apresenta na Figura 5.11 foi possível quantificar o β -caroteno, luteína, zeaxantina e β -criptoxantina em todas as estações do ano. No caso da amostra recolhida no verão foi ainda possível detetar o α -caroteno, mas o seu teor encontrava-se abaixo do limite de quantificação. A amostra da primavera revelou o maior teor em zeaxantina. O β -caroteno foi o carotenoide predominante na primavera e a luteína foi maioritária no verão, outono e inverno. Ao longo do ano, a variação do teor total em carotenoides nas maçãs foi pouco significativa embora os teores de β -caroteno e luteína sejam superiores no outono. Dai ser aconselhável em termos de ingestão de carotenoides, o consumo de maçãs nessa época do ano tal como é indicado no documento apresentado no Anexo 2.

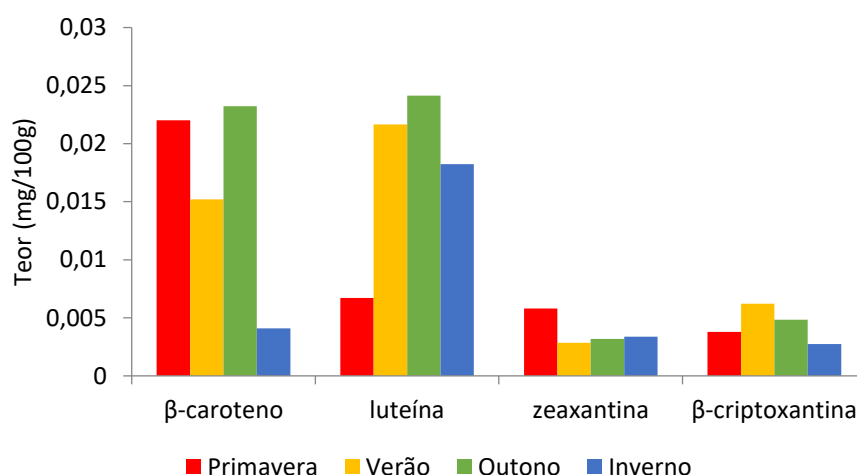


Figura 5.11- Teor de carotenoides em maçãs nas quatro estações do ano.

Com base na DMS é de salientar que:

- O teor em β -caroteno foi semelhante nas amostras recolhidas na estações da primavera e outono.
- O teor em luteína foi semelhante nas amostras recolhidas nas estações do verão, outono e inverno e significativamente superior ao da amostra recolhida na primavera.

A análise de resultados mostra que existiu alguma variabilidade nos teores de cada carotenoide nas diferentes estações do ano. As maiores variações ocorreram no teor de

luteína na estação da primavera e no do β -caroteno no inverno com teores inferiores aos verificados ao longo do ano.

- Pera

No que diz respeito à pêra (Figura 5.12) só foi possível detetar e quantificar luteína e zeaxantina em todas as estações do ano. Na primavera foi possível identificar o β -caroteno, mas o seu teor encontrava-se abaixo do limite de quantificação. Nas quatro estações do ano a luteína foi o carotenoide presente em maior quantidade, mas o seu teor foi significativamente superior no inverno. Na primavera, as peras apresentaram o maior teor de zeaxantina.

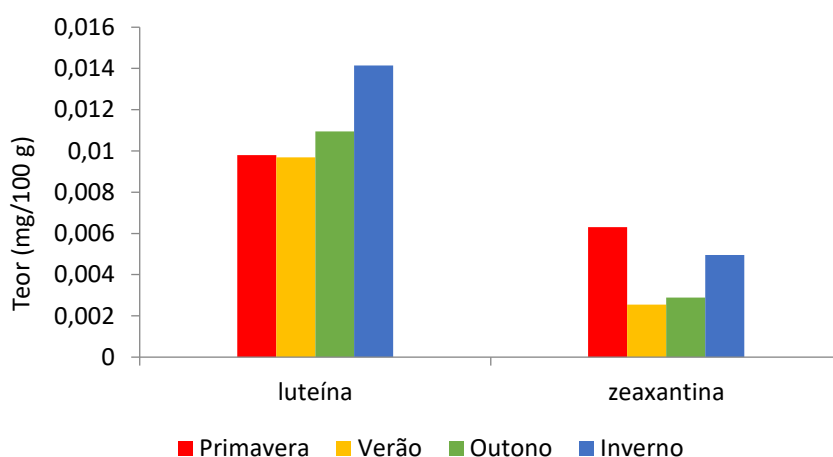


Figura 5.12- Teor de carotenoides em pêras nas quatro estações do ano.

Com base na DMS é de realçar que:

- O teor em luteína nas estações da primavera, verão e outono foi semelhante e inferior ao encontrado no inverno.
- Os teores de zeaxantina nas peras na primavera e inverno foram semelhantes e superiores aos que se encontraram no verão e outono os quais também foram semelhantes entre si.

- Figos secos

Relativamente aos figos, pela observação do gráfico de barras da Figura 5.13 verifica-se a presença de β -caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina e β -criptoxantina. Não foi possível detetar α -caroteno em nenhuma das amostras. Para além disso, no verão e no outono não foi possível quantificar o β -caroteno e na primavera e no verão não foi detetado licopeno

nos figos. A zeaxantina e luteína foram encontradas em todas as estações do ano embora com teores mais elevados na primavera.

Quanto ao teor total de carotenoides, verificou-se uma variação pouco significativa ao longo do ano, apresentando o maior valor na primavera.

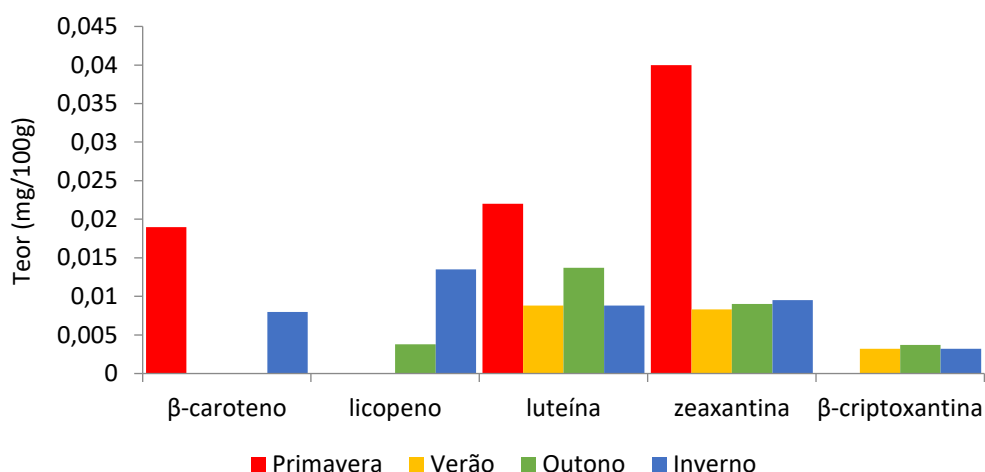


Figura 5.13- Teor de carotenoides em figos secos nas quatro estações do ano.

Com base nos resultados da DMS destaca-se que o teor em β-caroteno foi diferente entre as amostras recolhidas na estação da primavera e inverno; o teor em zeaxantina e luteína é superior na amostra recolhida na estação da primavera; o teor em licopeno é superior na estação do inverno; o teor em β-criptoxantina não apresentou diferenças significativas nas estações em que foi detetado.

- **Melão**

Quanto à melão (Figura 5.14), com as análises efetuadas, verificou-se apenas a presença de β-caroteno e luteína nas duas estações do ano (primavera e verão). O carotenoide preponderante tanto na primavera como no verão foi o β-caroteno.

Na primavera o teor total de carotenoides é superior ao determinado no verão pelo que, em termos dos carotenoides disponível, é aconselhável o consumo de melão durante a primavera, fato que não coincide com o período recomendado no documento no Anexo 2.

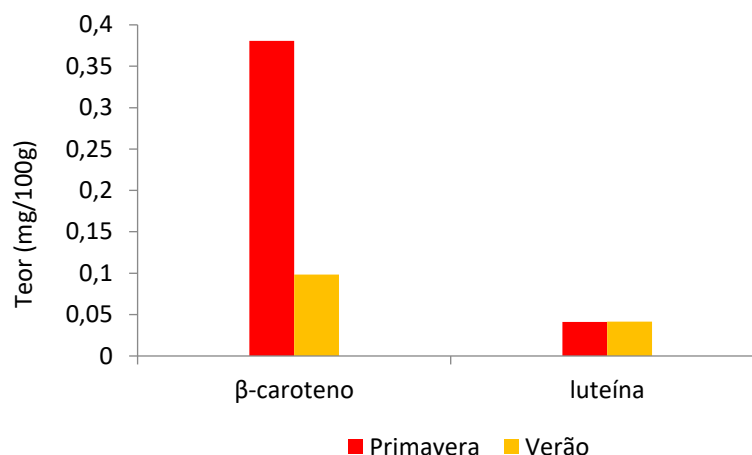


Figura 5.14- Teor de carotenoides em meloa em duas estações do ano.

Com base na DMS verifica-se:

- O teor em β-caroteno foi superior na estação da primavera e diferente do determinado no verão.
- O teor em luteína na meloa foi semelhante na primavera e no verão.

- Melão

Relativamente ao melão (Figura 5.15), verificou-se apenas a presença de β-caroteno e luteína. No verão verificaram-se maiores teores de β-caroteno e luteína do que na primavera. Os resultados obtidos sugerem que o teor total em carotenoides é superior no verão pelo que a ingestão de melão nessa época do ano possibilita uma maior ingestão de carotenoides, facto que coincide com o período recomendado (Anexo 2).

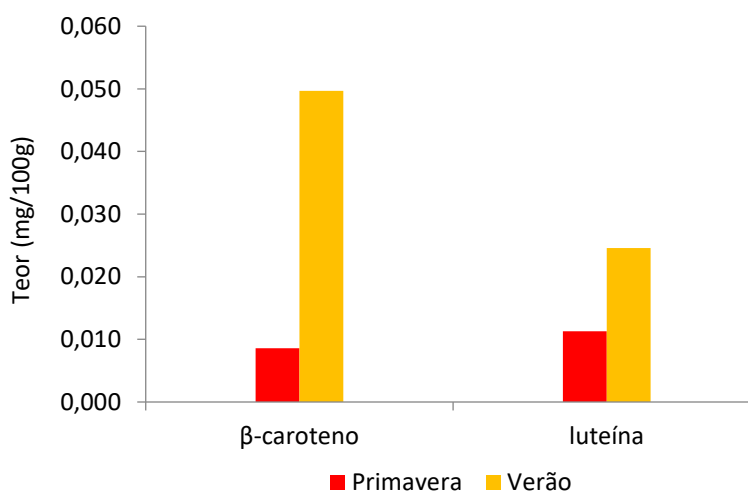


Figura 5.15- Teor de carotenoides em amostras de melão em duas estações do ano.

Com base na DMS verifica-se que:

- Os teores em β -caroteno são diferentes nas amostras disponíveis na estação da primavera e do verão. O mesmo se passa com a luteína.

-Avaliação da sazonalidade

Em relação à avaliação do efeito da sazonalidade nas amostras de frutos observaram-se diferenças significativas no teor em carotenoides ao longo das estações o que sugere que o efeito da sazonalidade exerce influência no teor em carotenoides. Esta variação do teor em carotenoides ao longo do ano pode claramente influenciar a ingestão de carotenoides nas diferentes estações do ano. Na Tabela 5.3 é apresentada a época considerada como ideal em termos de ingestão de carotenoides e a época recomendada (Anexo 2).

Tabela 5.3–Época ideal, em termos de ingestão de carotenoides e época recomendada para o consumo de frutos em Portugal.

Amostras	Época Ideal [#]	Época Recomendada [*]	Observações
Salada de Frutas	Outono	Não definida	primavera maior ingestão de α -caroteno e β -caroteno; verão de licopeno
Uvas	Verão	Junho/Outubro	verão maior ingestão de luteína; primavera de β -caroteno e zeaxantina
Laranja	Primavera	Janeiro/Maio e Outubro/Dezembro	primavera maior ingestão de β -caroteno, luteína, zeaxantina e β -criptoxantina
Maça	Outono	Janeiro/Abril e Julho/Dezembro	outono maior ingestão de β -caroteno e luteína; verão de β -criptoxantina
Pêra	Inverno	Janeiro/Março e Junho/Dezembro	inverno maior ingestão de luteína e zeaxantina
Figos secos	Primavera	Não definida	primavera maior ingestão de β -caroteno, luteína e zeaxantina; outono de β -criptoxantina
Melo	Primavera	Junho/Setembro	primavera maior ingestão de β -caroteno
Melão	Verão	Junho/Setembro	verão maior ingestão de β -caroteno e luteína

[#]-De acordo com os teores totais.

^{*}-De acordo com período recomendado para consumo (Anexo 2).

Conforme se pode verificar pela Tabela 5.3, para todos os frutos analisados em que se verificou o efeito da sazonalidade, à excepção da meloa, a época ideal de ingestão de carotenoides corresponde à época recomendada.

5.2.2. Comparação com os resultados da literatura

No sentido de comparar os teores em carotenoides obtidos neste trabalho para as amostras de frutas (Tabela 5.2) com os resultados da literatura, apresenta-se na Tabela 5.4 uma comparação do intervalo de resultados determinados neste trabalho com os obtidos por outros autores.

Tabela 5.4 Comparação do teor em carotenoides (mg/100 g) obtido neste trabalho com os resultados da literatura.

Amostras	Ref.	α -caroteno	β -caroteno	Licopeno	Luteína	Zeaxantina	β -criptoxantina
Uvas	Este trabalho	ND	0,020-0,027	ND	0,022-0,057	0,0036-0,0054	ND
	Bunea et al. (2012)	-	0,0232-0,0593	--	0,0471-0,0825	-	-
	Oliveira et al. (2006)	-	0,0168-0,0910	-	0,0218-0,1044	-	-
Laranja	Este trabalho	0,0084	0,0072-0,060	ND	0,0069-0,024	0,019-0,055	0,034-0,056
	Murillo et al. (2010)	-	-	-	0,03±0,01	0,03±0,01	-
	Dias et al. (2009)	0,011-0,027	0,017-0,043	-	0,034-0,072	0,066-0,19	0,11-0,23
Maçã	Este trabalho	(0,0011)	0,0041-0,023	ND	0,0067-0,024	0,0028-0,0058	0,0027-0,0062
	Dias et al. (2009)	-	0,010-0,063		0,0032-0,017	0,0030	0,004
Pêra	Este trabalho	ND	(0,0016)	ND	0,0097-0,014	0,0026-0,0063	ND
	Dias et al. (2009)	-	(0,0013-0,0015)	-	0,0043-0,0088	-	0,0018-0,0025
Figos secos	Este trabalho	ND	0,0080-0,019	0,0038-0,014	0,0088-0,022	0,0083-0,040	0,0032-0,0037
	Su et al. (2002)	0,02	0,04	0,32	0,08	-	0,01
Melão	Este trabalho	ND	0,0086-0,050	ND	0,011-0,025	ND	ND
	Murillo et al. (2010)	-	-	-	0,03±0,01	0,01±0,01	-
	Vargas Murga et al. (2016)	-	0,01	-	-	-	-

ND-Não detetado (limites de deteção em mg/100g: α -caroteno-0,0009, β -caroteno-0,001, licopeno-0,0008, luteína-0,0007, zeaxantina-0,0008 e β -criptoxantina-0,0006)

() – Entre o limite de deteção e o limite de quantificação (limites de quantificação em mg/100 g: α -caroteno-0,002, β -caroteno-0,003, licopeno-0,003, luteína- 0,002, zeaxantina-0,002 e β -criptoxantina-0,002).

Os valores de β -caroteno, licopeno, luteína e zeaxantina obtidos por *Su et al.* (2002) para figos disponíveis no mês de Abril são relativamente superiores aos obtidos neste trabalho. Neste trabalho, não foi detetada a presença de α -caroteno conforme foi detetado por estes autores, contudo, seria de esperar existirem diferenças entre os resultados uma vez que neste trabalho foram analisados figos secos e o processamento pode ter afetado o teor de carotenoides.

Os resultados de β -caroteno e de luteína obtidos neste trabalho estão dentro da gama de valores referida por *Bunea et al.* (2012) para diferentes variedades de uvas. *Oliveira et al.* (2006) também realizaram um estudo sobre o teor de carotenoides presentes em diferentes variedades de uvas e obtiveram teores de β -caroteno e de luteína que se encontram dentro do intervalo de valores obtidos neste trabalho.

Os teores de luteína e zeaxantina obtidos neste trabalho para amostras de laranjas encontram-se dentro da gama de valores referido por *Murillo et al.* (2010). Os teores em β -caroteno e zeaxantina obtidos por *Dias et al.* (2009) para amostras de laranja recolhidas no mês de abril apresentaram resultados que se encontram dentro da gama de valores obtidos neste trabalho para os mesmos carotenoides. Quanto aos teores em α -caroteno e β -criptoxantina, o resultado obtido neste trabalho encontra-se abaixo da gama de valores obtida por *Dias et al.* (2009).

Os teores em β -caroteno, luteína, zeaxantina e β -criptoxantina obtidos neste trabalho encontram-se dentro da gama de valores obtidos por *Dias et al.* (2009) para amostras de maçãs de diferentes variedades recolhidas no mês de outubro.

Os teores de β -caroteno e luteína obtidos neste trabalho são ligeiramente superiores aos valores obtidos por *Dias et al.* (2009) para peras recolhidas no mês de novembro. Não foi detetada a presença de β -criptoxantina no presente trabalho conforme foi detetado por *Dias et al.* (2009).

Os teores em luteína obtidos para as amostras de melão encontram-se dentro da gama de valores referenciado *Murillo et al.* (2010). Quanto a gama de teores em β -caroteno obtidos neste trabalho, também se encontra dentro do valor obtido por *Vargas-Murga et al.* (2008-2009).

As diferenças no teor em carotenoides observadas nos frutos podem estar relacionadas com o facto de na época de colheita não ter havido degradação dos carotenoides relacionada com a armazenagem.

5.3. Carotenoides em produtos hortícolas - influência da sazonalidade

Conforme já foi abordado no Capítulo 4 - Materiais e Métodos, foram analisadas diversas amostras de produtos hortícolas (batata, brócolos, tomate, alface, grelos, nabiças, cenouras, couve-flor, pimentos e feijão-verde recolhidas em diferentes estações do ano (verão, outono e inverno) no âmbito do projeto TSDExposure (Total Diet Study, Estudo de Dieta Total). Para o estudo da influência da sazonalidade foram analisados brócolos, tomate, alface, grelos, nabiças, cenouras, couve-flor, pimentos, feijão-verde e estudou-se a influência da sazonalidade para duas estações do ano (primavera e verão).

Os resultados obtidos para a amostra de batata na primavera não foram obtidos no âmbito desta tese e apresentam-se com o fim de fazer o estudo comparativo entre as quatro estações do ano.

De igual modo, para o estudo do efeito da sazonalidade, utilizou-se a Diferença Mínima Significativa (DMS) para a avaliação das diferenças entre os teores de carotenoides nas amostras ao longo do ano, calculada a partir de incerteza expandida da medição para um nível de significância de 5% (Dias et al., 2009). No Anexo 8 , apresenta-se a DMS calculada para cada um dos carotenoides nas amostras de produtos hortícolas analisadas.

5.3.1. Influência da sazonalidade

Os teores em carotenoides obtidos para cada amostra de produtos hortícolas encontram-se representado na Tabela 5.5.

Tabela 5.5- Teores dos carotenoides nas amostras de produtos hortícolas-sazonalidade.

Amostras	Estação	Teor (mg/100 g)*						
		α -caroteno	β -caroteno	Licopeno	Luteína	Zeaxantina	β -criptoxantina	C.Totais (mg/100g)**
Batata	Primavera [#]	ND	0,0052	ND	0,027 ^a	0,018 ^a	ND	0,050
	Verão	ND	ND	ND	0,027 ^a	0,023 ^a	ND	0,051
	Outono	ND	ND	ND	0,026 ^a	0,011 ^b	ND	0,037
	Inverno	ND	ND	ND	0,038 ^b	0,010 ^b	ND	0,049
Brócolos	Primavera	ND	0,48 ^a	ND	0,97 ^a	ND	ND	1,4
	Verão	ND	0,43 ^a	ND	1,2 ^a	ND	ND	1,6
Tomate	Primavera	ND	0,24 ^a	1,5 ^a	0,19 ^a	ND	ND	1,9
	Verão	ND	0,39 ^b	3,2 ^b	0,17 ^a	ND	ND	3,7
Alface	Primavera	ND	0,45 ^a	ND	0,65 ^a	ND	ND	1,1
	Verão	ND	1,2 ^b	ND	1,4 ^b	ND	ND	2,6
Grelhos	Primavera	ND	3,5 ^a	ND	6,8 ^a	ND	ND	10
	Verão	ND	3,1 ^a	ND	5,5 ^a	ND	ND	8,6
Nabiças	Primavera	ND	4,7 ^a	ND	7,5 ^a	ND	ND	12
	Verão	ND	3,4 ^b	ND	6,3 ^a	ND	ND	9,6
Cenouras	Primavera	2,7 ^a	8,2 ^a	ND	0,58 ^a	ND	ND	12
	Verão	5,7 ^b	8,9 ^a	ND	0,71 ^a	ND	ND	15
Couve-flor	Primavera	ND	0,0040 ^a	ND	0,020 ^a	ND	ND	0,023
	Verão	ND	0,0035 ^a	ND	0,020 ^a	ND	ND	0,024
Pimentos	Primavera	ND	1,2 ^a	ND	0,47 ^a	0,21 ^a	ND	1,9
	Verão	ND	0,51 ^b	ND	0,22 ^b	0,14 ^a	ND	0,87
Feijão-verde	Primavera	0,018 ^a	0,15 ^a	ND	0,27 ^a	ND	ND	0,44
	Verão	0,051 ^b	0,33 ^b	ND	0,72 ^b	ND	ND	1,1

ND-Não detetado (limites de deteção em mg/100g: α -caroteno-0,0009, β -caroteno-0,001, licopeno-0,0008, luteína-0,0007, zeaxantina-0,0008 e β -criptoxantina-0,0006).

* – Para cada tipo de amostra resultados que apresentem letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$)

[#] – Silva (2014).

** Carotenoides Totais

Pela análise dos resultados obtidos para todas as amostras de produtos hortícolas (Tabela 5.5) é possível verificar que os carotenoides presentes na maior parte das matrizes alimentares são o β -caroteno (em 90% das amostras) e luteína sendo que a luteína é o único carotenoide presente em todas as amostras analisadas. A β -criptoxantina é o único carotenoide que não foi detetado em nenhuma das amostras analisadas.

Relativamente aos teores mais elevados de cada carotenoide, a amostra de cenouras foi a que apresentou maior teor de α -caroteno (5,7 mg/100 g) e β -caroteno (8,9 mg/100 g); a luteína apresentou um teor mais elevado nas amostras de nabijas (7,5 mg/100 g); o tomate é a única amostra em que foi possível detetar e quantificar licopeno; a amostra de pimentos foi a que apresentou um teor mais elevado de zeaxantina (0,21 mg/100 g).

Procedendo agora a uma discussão mais pormenorizada para cada um dos produtos hortícolas, apresentam-se os resultados sob a forma de um gráfico de barras de forma a facilitar a sua comparação.

- Batata

As amostras de batatas analisadas (Figura 5.16), contêm β -caroteno, luteína e zeaxantina sendo que a primavera foi a única estação do ano em que foi detetado o β -caroteno. A luteína é o carotenoide que se encontra em maior quantidade nas quatro estações do ano sendo que a amostra recolhida no inverno foi a que apresentou o teor mais elevado (0,038 mg/100 g).

O teor total de carotenoides disponível nas batatas foi superior na primavera e no verão, período que também é recomendado para o consumo deste produto (Anexo 2).

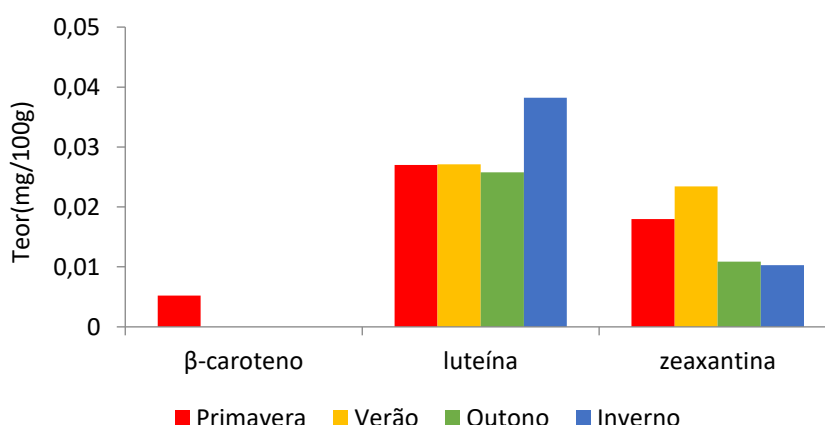


Figura 5.16- Teor de carotenoides em amostras de batatas nas quatro estações do ano.

Pelos resultados da DMS é de notar que:

- Os teores em luteína e zeaxantina foram semelhantes nas amostras recolhidas na estação da primavera e verão, sendo no inverno o valor significativamente superior para a luteína.

- Brócolos

Relativamente aos brócolos, pela observação do gráfico da Figura 5.17 verifica-se que foi possível quantificar o β -caroteno e a luteína. A luteína foi o carotenoide que se encontrou em maior quantidade nas duas estações do ano.

Em termos do teor total encontram-se valores semelhantes na primavera e no verão.

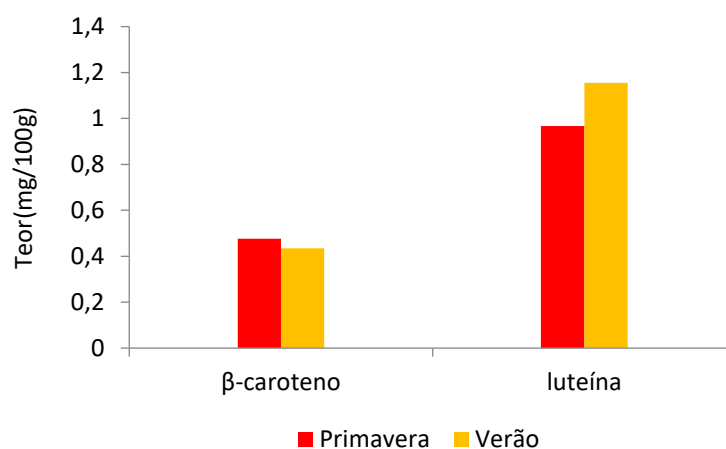


Figura 5.17- Teor de carotenoides em amostras de brócolos em duas estações do ano.

Pelos resultados obtidos para a DMS nota-se que não existem diferenças significativas nos teores de luteína e β -caroteno nas duas estações do ano.

- Tomate

No que diz respeito ao tomate (Figura 5.18), com as análises efetuadas verificou-se a presença de β -caroteno, licopeno e luteína nas duas estações do ano. O licopeno foi o carotenoide que se encontrou em maior quantidade nas amostras de tomate sendo que no verão foi o seu teor mais elevado (3,2 mg/100 g). Quanto ao β -caroteno, a amostra recolhida no verão também é a que apresenta o teor mais elevado (0,39 mg/100 g).

Os resultados mostraram ainda que o consumo de tomate no verão permite uma maior ingestão de carotenoides. O verão é também a época recomendada para o consumo do tomate (Anexo 2).

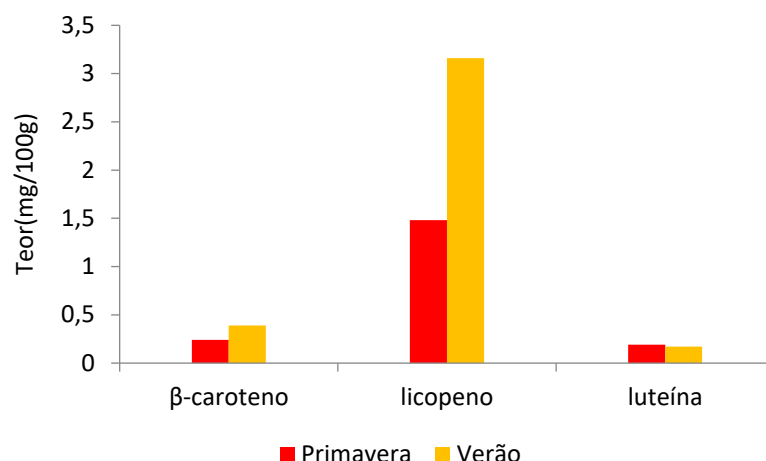


Figura 5.18- Teor de carotenoides em amostras de tomate em duas estações do ano.

Com base na DMS é de salientar que os teores de licopeno e β -caroteno são diferentes na da primavera e verão, mas no teor em luteína não se encontraram diferenças significativas nas duas estações do ano.

- Alface

No que diz respeito às amostras de alface, pela observação do gráfico da Figura 5.19, foram quantificados β -caroteno e luteína. A luteína foi o carotenoide que se encontrou em maior quantidade nas duas estações do ano, sendo que a amostra recolhida no verão que apresentou o teor mais elevado (1,4 mg/100 g). Os resultados obtidos sugeriram ainda que o teor total em carotenoides é superior no verão, sendo preferível o seu consumo nessa época do ano em Portugal em comparação com a primavera.

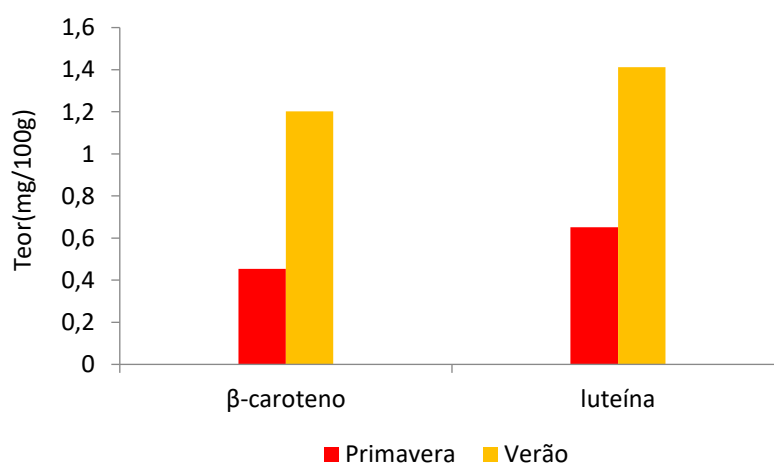


Figura 5.19- Teor de carotenoides em amostras de alface em duas estações do ano.

A determinação da DMS permite afirmar que os teores de β -caroteno e luteína nas amostras na primavera e no verão, são diferentes e mais elevados no verão.

- Grelos

Quanto aos grelos, analisando o gráfico da Figura 5.20 verificou-se a presença de β -caroteno e luteína nas amostras de grelos analisadas. A luteína foi o carotenoide predominante nas duas estações do ano.

Em termos do total de carotenoides disponível nos grelos, os resultados indicaram ser, aproximadamente, indiferente o seu consumo na primavera ou no verão.

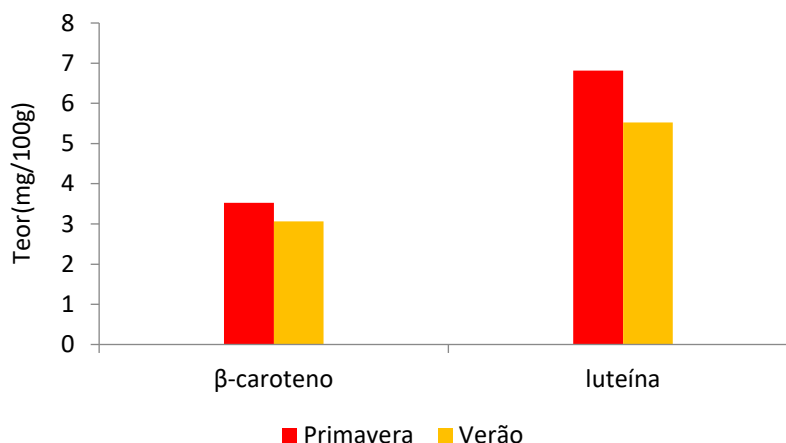


Figura 5.20- Teor de carotenoides em amostras de grelos em duas estações do ano.

Com base na DMS verificou-se que os teores de β -caroteno foram semelhantes nas duas estações do ano e o mesmo se passou com a luteína.

- Nabijas

Nas nabijas foi possível quantificar o β -caroteno e a luteína (Figura 5.21). A luteína foi o carotenoide que se encontrou em maior quantidade tanto na primavera como no verão. Os resultados obtidos sugeriram que o teor total em carotenoides é superior na primavera, sendo preferível o seu consumo nessa época do ano em Portugal em comparação com o verão.

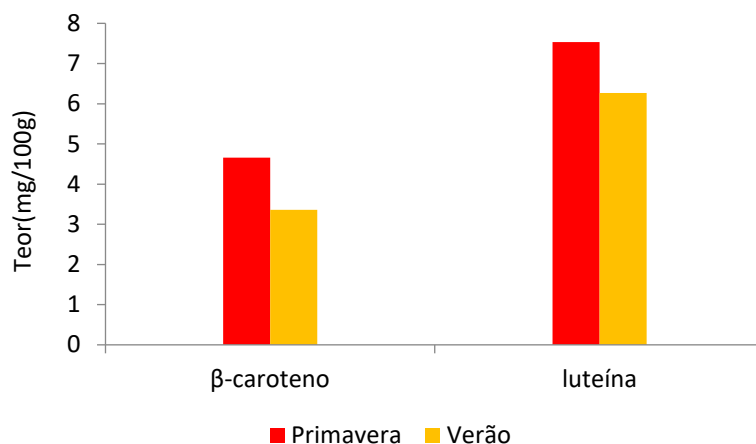


Figura 5.21- Teor de carotenoides em nabiças em duas estações do ano.

A determinação da DMS calculada para cada um dos carotenoides nas amostras de nabiças analisadas, permitiu afirmar que:

- Os teores de β -caroteno foram diferentes nas duas estações do ano em avaliação.
- Os teores em luteína foram iguais na primavera e no verão.

- Cenoura

Em relação à cenoura (Figura 5.22), com as análises efetuadas verificou-se a presença de α -caroteno, β -caroteno e luteína. O β -caroteno é o carotenoide que se encontra em maior quantidade nas duas amostras de cenouras recolhidas. A luteína é o carotenoide presente em menor quantidade. Os resultados obtidos sugeriram que o teor total em carotenoides é superior no verão.

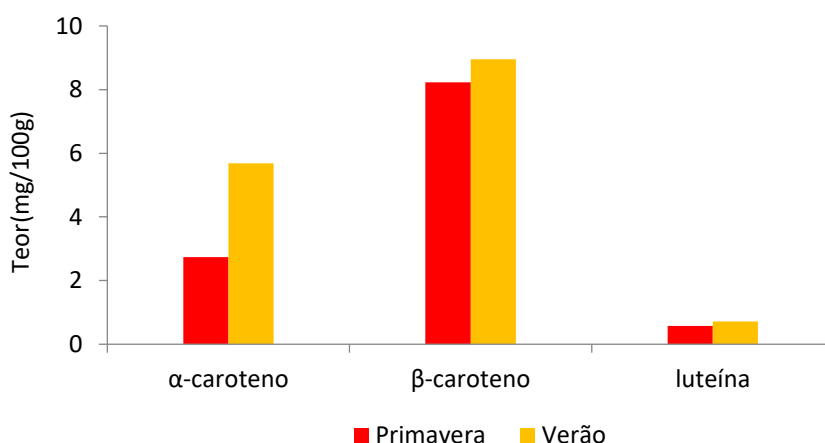


Figura 5.22- Teor de carotenoides em cenouras em duas estações do ano.

Com base na DMS calculada destaca-se que:

- O teor em α -caroteno foi diferente para as duas estações do ano em estudo.
- Os teores em β -caroteno e luteína foram semelhantes na primavera e no verão.

- Couve-flor

No que se refere à couve-flor (Figura 5.23), verificou-se a presença de β -caroteno e luteína. A luteína foi o carotenoide predominante na couve-flor nas duas estações do ano. O β -caroteno foi o carotenoide presente em menor quantidade. Em termos do teor total encontram-se valores semelhantes na primavera e no verão, sendo o consumo de couve-flor indiferente na primavera ou no verão.

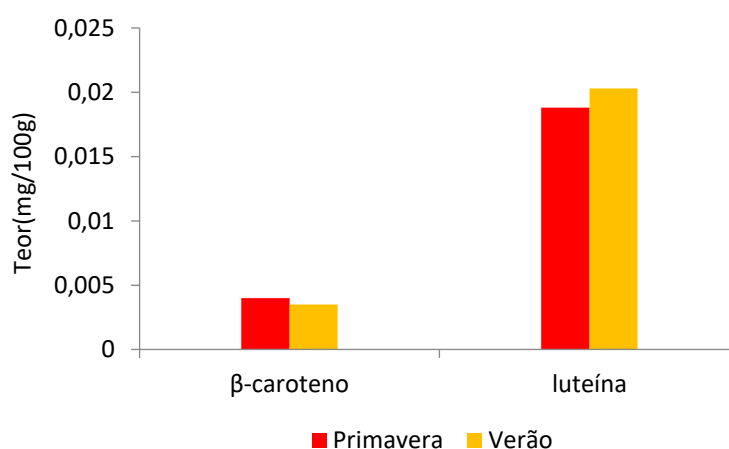


Figura 5.23- Teor de carotenoides em couve-flor nas duas estações do ano.

A determinação da DMS permitiu verificar que o teor em β -caroteno foi semelhante para as duas estações estudadas; o mesmo se passou para a luteína.

- Pimentos

Quanto aos pimentos (Figura 5.24), verificou-se a presença de β -caroteno, luteína e zeaxantina. O β -caroteno foi o carotenoide predominante nas duas estações do ano, sendo que a estação da primavera apresentou um teor mais elevado (1,2 mg/100 g). A zeaxantina foi o carotenoide presente em menor quantidade. Os resultados obtidos sugeriram que o teor total em carotenoides é superior na primavera.

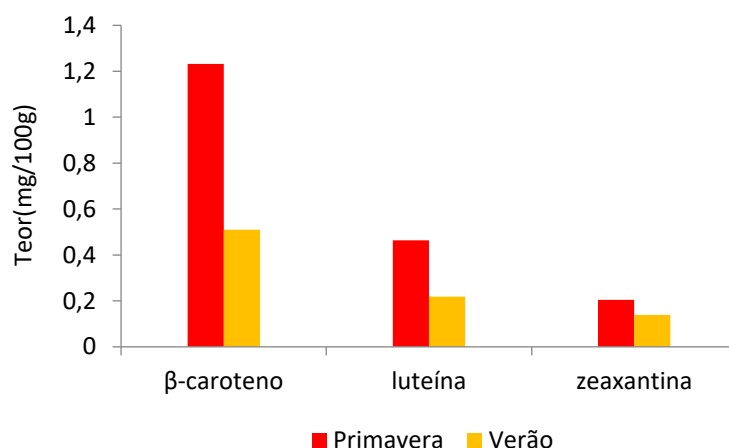


Figura 5.24- Teor de carotenoides em pimentos nas duas estações do ano.

Com base na DMS calculada verificou-se que os teores em β -caroteno são diferentes e superiores aos teores do verão para as duas estações do ano em estudo; o mesmo se passou para a luteína; a zeaxantina apresentou teores semelhantes na primavera e no verão.

- Feijão-verde

Em relação ao feijão-verde (Figura 5.25), foi possível quantificar α -caroteno, β -caroteno e luteína. A luteína foi o carotenoide que se encontrou em maior quantidade nas duas estações do ano sendo que a amostra recolhida no verão apresentou o teor mais elevado (0,72 mg/100 g). O α -caroteno foi o carotenoide menos predominante. Os resultados obtidos sugeriram que o teor total em carotenoides foi superior no verão correspondendo a época recomendada de consumo deste tipo de produto em Portugal (Anexo 2).

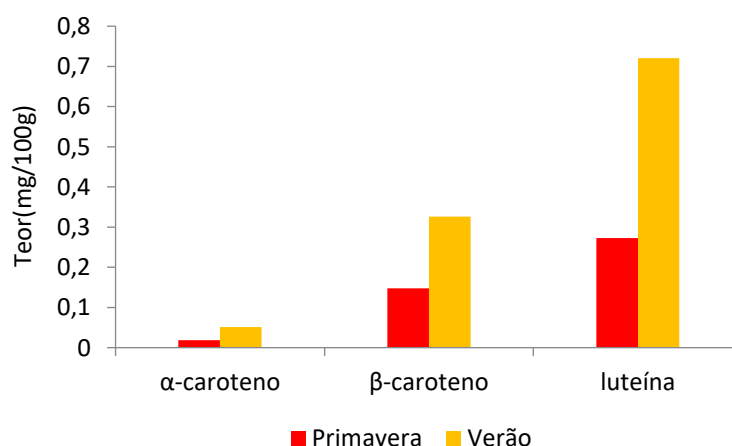


Figura 5.25- Teor de carotenoides em feijão-verde nas duas estações do ano.

Pela determinação da DMS foi possível verificar que o teor em α -caroteno foi diferente nas duas estações do ano e superior no verão; o mesmo se passou para o β -caroteno e a luteína.

-Avaliação do efeito da sazonalidade

Em relação à avaliação do efeito da sazonalidade nas amostras de produtos hortícolas também se verificou a influência no teor em carotenoides para as amostras de batata, tomate, alface, nabiças, cenouras, pimentos e feijão-verde. A variação do teor em carotenoides entre a primavera e o verão para estes produtos pode claramente influenciar a ingestão de carotenoides.

As amostras de produtos hortícolas cujo teor de carotenoides não foi afetado pela estação do ano, primavera e verão, foram os grelos, os brócolos e a couve-flor. Na Tabela 5.6 é apresentada a época considerada como ideal em termos da ingestão de carotenoides e a época recomendada (Anexo 2). À exceção da amostra de batata, é de salientar que a definição da época ideal de consumo apenas teve em consideração duas estações do ano, primavera e verão. No futuro, será desejável efetuar uma revisão da Tabela 5.6 com base em resultados obtidos no outono e inverno.

Tabela 5.6–Época ideal, em termos de ingestão de carotenoides e época para o consumo de produtos hortícolas em Portugal.

Amostras	Época Ideal [#]	Época Recomendada [*]	Observações
Batata	primavera/verão	Junho/Dezembro	inverno maior ingestão de luteína; verão de zeaxantina
Brócolos	primavera/verão	Janeiro/Junho e Outubro/Dezembro	-
Tomate	Verão	Junho/Outubro	verão maior ingestão de β -caroteno e licopeno; primavera de luteína
Alface	Verão	Janeiro/Junho e Setembro/Dezembro	verão maior ingestão de β -caroteno e luteína
Grelos	primavera/verão	Janeiro/Maio e Outubro/Dezembro	-
Nabiças	primavera	Janeiro/Maio e Outubro/Dezembro	primavera maior ingestão de β -caroteno e luteína
Cenouras	Verão	Janeiro/Dezembro	verão maior ingestão de α -caroteno, β -caroteno e luteína
Couve-flor	primavera/verão	Não definida	-
Pimentos	primavera	Junho/Novembro	primavera maior ingestão de β -caroteno, luteína e zeaxantina
Feijão-verde	Verão	Junho/Setembro	verão maior ingestão de β -caroteno e luteína

[#]-De acordo com os teores totais.

^{*}-De acordo com período recomendado para consumo (Anexo 2).

Conforme se pode verificar pela Tabela 5.6, para todos os produtos hortícolas analisados em que se verificou o efeito da sazonalidade, à excepção da alface e dos pimentos, a época ideal de ingestão de carotenoides corresponde a época recomendada.

5.3.2. Comparação com os resultados da literatura

No sentido de comparar os teores em carotenoides obtidos para as amostras de produtos hortícolas (Tabela 5.5) com os resultados da literatura, apresenta-se na Tabela 5.7 uma comparação do intervalo de resultados obtidos neste trabalho com os obtidos por outros autores.

Tabela 5.7- Comparação do teor em carotenoides (mg/100 g) obtido neste trabalho com os resultados da literatura.

Amostra	Ref.	Mês de colheita	α -caroteno	β -caroteno	Licopeno	Luteína	Zeaxantina	β -criptoxantina
Batatas	Este trabalho	-	ND	0,0052	ND	0,026-0,038	0,010-0,023	ND
	Murillo et al. (2010)	-	-	-	-	0,07 \pm 0,0 ₁	0,77 \pm 0,06	-
	Heinonen et al.(1989)	-	-	0,0032-0,0077	-	0,013-0,060	-	-
Brócolos	Este trabalho	-	ND	0,043-0,048	ND	0,97-1,2	ND	ND
	Murillo et al. (2010)	-	-	-	-	0,14 \pm 0,0 ₂	-	-
	Heinonen et al.(1989)	-	-	1,0	-	1,8	-	0,024
Tomates	Este trabalho	-	ND	0,24-0,39	1,5-3,2	0,17-0,19	ND	ND
	Maiani et al (2009)	-	-	0,320-1,5	0,850-12,7	0,046-0,213	-	-
	Dias et al. (2009)	-	-	0,3717-0,4279	1,9894-2,5301	0,0723-0,0802	-	-
	Heinonen et al.(1989)	junho a agosto	-	0,390-0,580;	3,80-6,60	0,05-0,110	-	-
		outubro a março	-	0,610 a 0,850	2,60-3,10	0,1	-	-
Alfices	Este trabalho	-	ND	0,45-1,2	ND	0,65-1,4	ND	ND
	Murillo et al. (2010)	-	-	-	-	0,2 \pm 0,01	-	-
	Maiani et al. (2009)	-	-	0,870-2,960	-	1-4,78	-	-
	Heinonen et al.(1989)	junho a agosto	-	0,730-0,790	-	1,20-1,24(luteína +zeaxantina);		-
		outubro a março	-	0,860-1,10	-	1,8-2,20 (luteína +zeaxantina)		-

Nabiças	Este trabalho	-	ND	3,4-4,7	ND	6,3-7,5	ND	ND
	Dias et al. (2009)	-	-	4,4	-	5,6	-	-
Cenouras	Este trabalho	-	2,7-5,7	8,2-8,9	ND	0,58-0,71	ND	ND
	Murillo et al. (2010)	-	-	-	-	0,36±0,05	-	-
	Maiani et al. (2009)	-	2,84-4,96	4,35-8,84	-	0,254-0,510	-	-
	Heinonen et al.(1989)	junha a agosto	2,40-2,90	2,60 a 5,50	-	0,260		-
		outubro a março	0,53-2,20	4,60-7,70		0,220-0,300		
Couve-flor	Este trabalho	-	ND	0,0035-0,0040	ND	0,020	ND	ND
	Kandlakunta et al. (2008)	-	-	0,002±0,00055	-	-	-	-
	Heinonen et al.(1989)	-	-	0,011	-	-	-	-
Pimentos	Este trabalho	-	-	0,51-1,2		0,22-0,47	0,14-0,21	ND
	Heinonen et al.(1989)	-	0,092 (amarelo)	0,240 (verde); 0,150 (vermelho) ; 2,90 (amarelo)	-	0,700 (verde); 0,770 (amarelo)	-	-
Feijão-verde	Este trabalho	-	0,018-0,051	0,15-0,33	ND	0,27-0,72	ND	ND
	Kandlakunta et al. (2008)	-	0,239	-	-	-	-	-
	Maiani et al. (2009)	-	0,503	-	-	0,0883	-	-

Heinonen et al. (1989) obtiveram valores de β -caroteno e luteína dentro da gama de valores obtidos neste trabalho para as batatas.

Quanto aos brócolos, os teores de luteína obtidos neste trabalho encontram-se acima da gama de valores obtida por *Murillo et al.* (2010). Quanto aos teores de β -caroteno e de

luteína obtidos por *Heinonen et al.* (1989), encontram-se acima do intervalo de valores obtidos neste trabalho. Não foi detetada a presença de β -criptoxantina conforme foi reportado por *Heinonen et al.* (1989).

No que se refere às amostras de tomate, a gama de teores de β -caroteno, licopeno e luteína obtidos neste trabalho encontra-se dentro do intervalo de valores reportado por *Maiani et al.* (2009). Os teores de β -caroteno obtidos neste trabalho encontram-se dentro da gama de valores referenciados *Dias et al.* (2009). Os teores de β -caroteno obtidos neste trabalho encontram-se dentro do intervalo de valores referenciados por *Heinonen et al.* (1989) para as amostras de tomate recolhidas no período de junho a agosto. Os teores de licopeno obtidos neste trabalho encontram-se dentro do intervalo de valores referenciados *Heinonen et al.* (1989) para as amostras de tomate recolhidas no período de outubro a março.

Em relação as alfaces, os teores de β -caroteno e luteína obtidos neste trabalho, encontram-se dentro da gama de valores reportados por *Maiani et al.* (2009). Os teores em β -caroteno obtidos neste trabalho encontram-se dentro do intervalo de valores reportados por *Heinonen et al.* (1989) para as amostras de alface obtidas no período de junho a agosto e de outubro a março.

Os teores de β -caroteno obtidos neste trabalho para as amostras de nabiças encontram-se dentro da gama de valores reportada por *Dias et al.* (2009). Os teores de α -caroteno e β -caroteno obtidos neste trabalho encontram-se dentro da gama de valores obtida por *Maiani et al.* (2009).

Os teores de α -caroteno obtidos neste trabalho para as amostras de cenouras encontram-se dentro da gama de valores reportada por *Heinonen et al.* (1989) para as amostras recolhidas no período de junho a agosto.

Para as amostras de couve-flor, os teores de β -caroteno obtidos neste trabalho encontram-se acima da gama de valores referenciados por *Kandlakunta et al.* (2008).

No que se refere aos pimentos, os teores de α -caroteno, β -caroteno e luteína obtidos neste trabalho encontram-se fora da gama de valores obtida por *Heinonen et al.* (1989) para pimentos vermelhos, amarelos e verdes. Este fato evidencia a necessidade da produção de dados sobre carotenoides em alimentos para os diferentes países.

Quanto ao feijão-verde, os teores de α -caroteno obtidos neste trabalho encontram-se abaixo da gama de valores referenciados por *Kandlakunta et al.* (2008) e *Maiani et al.* (2009).

Estas diferenças nos teores em carotenoides observadas nos produtos hortícolas em algumas amostras podem estar relacionadas com a forma de cultivo ao ar livre.

5.4. Carotenoides em amostras não avaliadas sob o ponto de vista da sazonalidade

5.4.1. Frutos

No presente trabalho, analisaram-se também quatro amostras de frutos, pêssago, banana, ananás e quivi que não foram avaliadas sob o ponto de vista da sazonalidade. Na Tabela 5.8 apresentam-se os teores de carotenoides presentes em várias amostras de frutos analisadas. Também foi apresentada uma comparação com os resultados obtidos por outros autores.

A Figura 5.26 apresenta os teores em carotenoides para os frutos analisados.

Tabela 5.8- Teores dos carotenoides presentes nas amostras de frutos analisadas (mg/100 g).

		Teor (mg/100 g)					
Frutas	Ref.	α -caroteno	β -caroteno	Licopeno	Luteína	Zeaxantina	β -criptoxantina
Pêssego	Este trabalho	ND	0,073	ND	0,024	0,016	0,093
	Dias et al. (2009)	0,0082	0,17	ND	0,075	0,026	0,21
	Maiani et al. (2009)	-	0,0040-0,17	-	-	-	0,016
	Heinonen et al (1989)	-	0,086	-	0,014	-	0,051
Banana	Este trabalho	0,047	0,055	ND	0,055	ND	ND
	Englberger et al. (2006)	0,0011-0,65	0,0011-0,65	-	0,0070-0,15	-	-
	Wall (2006)	0,060-0,16	0,043-0,13	ND	0,087-0,19	-	ND
	Heinonen et al (1989)	0,012	0,014	-	0,0033	-	-
Ananás	Este trabalho	ND	0,012	ND	ND	ND	0,0040
	Murillo et al. (2010)	-	-	-	0,010 \pm 0,010	0,010 \pm 0,010	-
Quiwi	Este trabalho	ND	0,046	ND	0,19	0,012	ND
	Murillo et al. (2010)	-	-	-	0,070 \pm 0,010	ND	-
	Frenich et al. (2005)	-	<0,020	<0,010	-	-	-

ND-Não detetado (limites de deteção em mg/100g: α -Caroteno-0,0009, β -Caroteno-0,001, Licopeno-0,0008, Luteína-0,0007, Zeaxantina-0,0008 e β -Criptoxantina-0,0006).

Com a análise efetuada às quatro amostras de frutos foi possível identificar e quantificar cinco carotenoides; o α -caroteno, o β -caroteno, a luteína, a zeaxantina e a β -criptoxantina.

Através do gráfico Figura 5.26 foi possível quantificar β -caroteno que é o carotenoide presente em todos os frutos analisados e a amostra de pêssago foi a que registou a um teor mais elevado deste carotenoide (0,073 mg/100 g). Por outro lado, a amostra de banana é a única que detetou α -caroteno. A amostra de pêssago foi a que apresentou maior diversidade de carotenoides (β -caroteno, luteína, zeaxantina e β -criptoxantina) sendo o teor de β -criptoxantina significativamente superior. A amostra de ananás foi a que registou menos carotenoides (β -caroteno e β -criptoxantina) e apresentou teores mais baixos. A amostra de quivi foi a que apresentou um teor de luteína superior (0,19 mg/100 g).

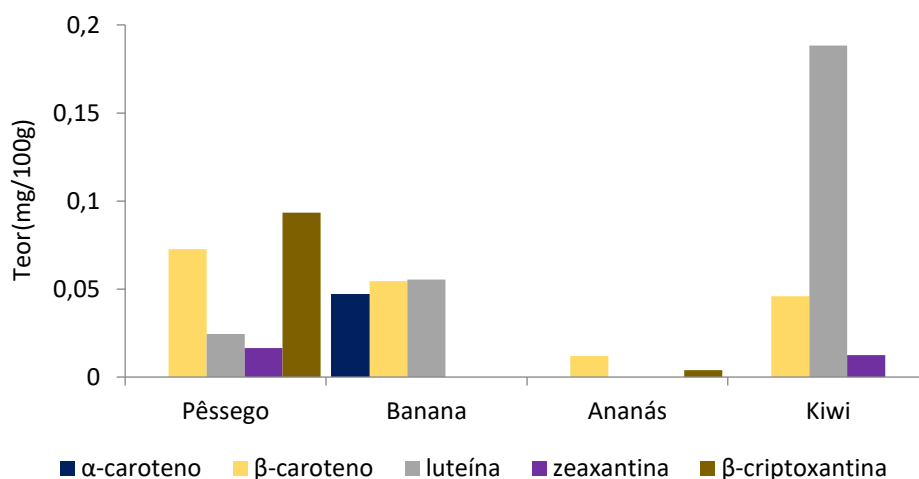


Figura 5.26- Teor de carotenoides nos frutos analisadas.

Para o pêssago, os teores de carotenoides obtidos neste trabalho são de uma forma geral semelhantes aos obtidos por *Dias et al. (2009)*, *Maiani et al. (2009)* e *Heinonen et al. (1989)*. Os teores de β -caroteno obtidos neste trabalho encontram-se dentro do intervalo referenciado por *Maiani et al. (2009)*. No entanto, no presente trabalho não foi detetada a presença de α -caroteno conforme foi reportado por *Dias et al. (2009)*.

Para a banana e comparativamente com os resultados obtidos por *Englberger et al. (2006)*, verifica-se que os teores obtidos neste trabalho se encontram dentro dos intervalos referidos por estes autores. Os teores de carotenoides referidos por *Wall (2006)* são próximos dos valores obtidos neste trabalho. Em comparação com os resultados de *Heinonen et al. (1989)*, os teores de carotenoides obtido neste trabalho são semelhantes aos referenciados neste artigo para o α -caroteno e β -caroteno.

Na amostra de ananás, não foi detetada a presença de luteína e zeaxantina conforme detetado por *Murillo et al. (2010)*.

Em relação à amostra de quivi, os teores de carotenoides obtidos neste trabalho são relativamente superiores aos obtidos por *Murillo et al. (2010)* e *Frenich et al. (2005)*. Não foi detetada a presença de licopeno conforme referenciado por *Frenich et al. (2005)*.

5.4.2. Cogumelos e leguminosas

A Tabela 5.9 apresenta o teor de carotenoides presentes nas três amostras de cogumelos e feijão analisadas.

Tabela 5.9- Teores dos carotenoides nas amostras de cogumelos, feijão e feijão-verde (mg/100 g).

Amostras	α -caroteno	β -caroteno	Licopeno	Luteína	Zeaxantina	β -criptoxantina
Cogumelos	ND	0,0207	0,0074	0,2325	ND	ND
Feijão	ND	ND	ND	0,016	0,0102	ND
Feijão-Frade	ND	ND	ND	0,1339	ND	ND

A figura 5.27 apresenta os teores em carotenoides para os produtos hortícolas analisados neste trabalho.

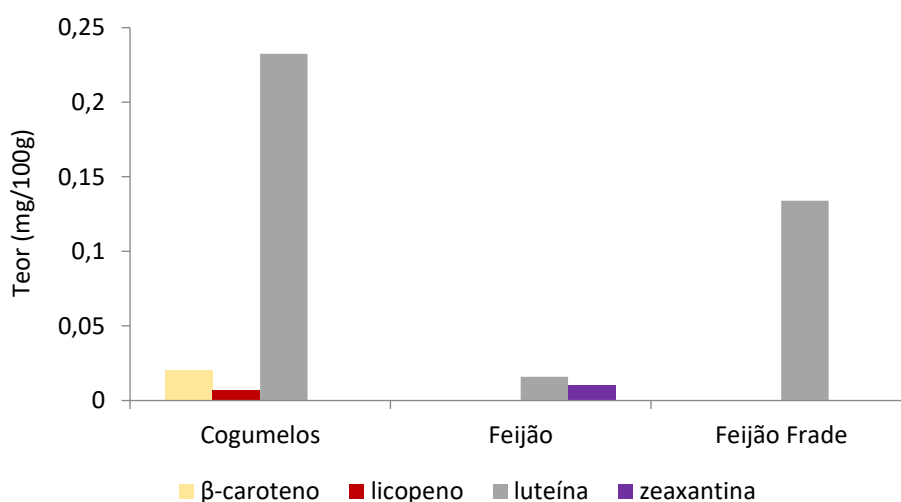


Figura 5.27- Teor de carotenoides nas amostras de cogumelos, feijão e feijão frade.

Com a análise efetuada a estas três amostras foi possível quantificar quatro carotenoides: o β -caroteno, o licopeno, a luteína e zeaxantina.

Através da observação do gráfico da Figura 5.27 foi possível verificar que a luteína foi o carotenoide presente em todas as amostras analisadas sendo que a amostra de cogumelos registou um maior teor. Por outro lado, a amostra de feijão foi a única que apresentou zeaxantina. A amostra de cogumelos, que foi preparada com molho de tomate, apresentou licopeno. A amostra de feijão-frade foi a que continha menos carotenoides (luteína).

Uma comparação com os resultados obtidos por outros autores é apresentada na tabela 5.10.

Tabela 5.10- Teores dos carotenoides nas amostras de cogumelos, feijão frade e feijão.

Amostras	Ref.	α -caroteno	β -caroteno	Licopeno	Luteína	Zeaxantina	β -criptoxantina
Cogumelos	Este trabalho	ND	0,0207	0,0074	0,2325	ND	ND
	Barros et al. (2008)	-	0,195-1,356	0,054-0,513	-	-	-
Feijão	Este trabalho	ND	ND	ND	0,016	0,0102	ND
	Murillo et al. (2010)	-	-	-	0,43 \pm 0,05	0,01 \pm 0,01	-
	Heinonen et al (1989)	0,039	0,180	-	0,440	-	-
Feijão-Frade	Este trabalho	ND	ND	ND	0,1339	ND	ND

ND-Não detetado (limites de deteção em mg/100g: α -Caroteno-0,0009, β -Caroteno-0,001, Licopeno-0,0008, Luteína-0,0007, Zeaxantina-0,0008 e β -Criptoxantina-0,0006)

Para os cogumelos, os valores obtidos por *Barros et al.* (2008) são relativamente superiores ao obtido neste trabalho.

Para o feijão, o teor em luteína obtido por *Murillo et al.* (2010) para amostras de feijão é mais elevado que o obtido neste trabalho, o mesmo não se verificou com o teor de

zeaxantina cujo valor é concordante com o obtido neste trabalho. Não foi detetada a presença de α -caroteno e β -caroteno conforme reportado por *Heinonen et al* (1989).

5.4.3. Produtos processados contendo frutos

Neste trabalho, também foram analisadas amostras de passas de uvas e de tarte de frutas cuja composição nutricional não foi avaliada sob o ponto de vista da sazonalidade. A tabela 5.11 apresenta o teor de carotenoides presentes nas duas amostras analisadas.

Tabela 5.11- Teores dos carotenoides nas amostras de passas de uvas e tarte de frutas (mg/100 g).

Amostras	α -caroteno	β -caroteno	Licopeno	Luteína	Zeaxantina	β -criptoxantina
Passas de uvas	ND	0,0167	ND	0,0382	0,0301	ND
Tarte frutas	ND	ND	ND	0,1584	0,1122	ND

ND-Não detetado (limites de deteção em mg/100g: α -Caroteno-0,0009, β -Caroteno-0,001, Licopeno-0,0008, Luteína-0,0007, Zeaxantina-0,0008 e β -Criptoxantina-0,0006).

Na Figura 5.28 apresentam-se os resultados sob a forma de um gráfico de barras de forma a facilitar a sua comparação.

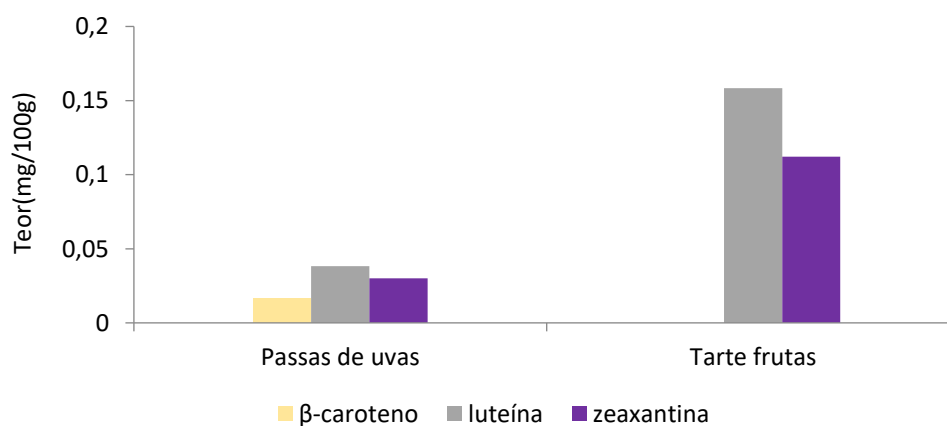


Figura 5.28- Teor de carotenoides nas passas de uvas e tarte de frutas.

Com a análise efetuada às duas amostras foi possível quantificar três carotenoides: o β -caroteno, a luteína e a zeaxantina. Através da observação do gráfico (na Figura 5.28) foi possível verificar que a luteína e a zeaxantina são os carotenoides presentes nas duas amostras analisadas sendo que a amostra de tarte de frutas registou um maior teor. A amostra de passas de frutos foi a única que apresentou β -caroteno.

6. Conclusões

De acordo com a revisão bibliográfica que foi realizada para os métodos analíticos para a determinação de carotenoides, verificou-se que o HPLC em fase reversa com um UV/Vis com fotodíodos foi o método mais utilizado, apesar de já existirem um número considerável de trabalhos realizados em que se utiliza UHPLC.

O método analítico, HPLC, permitiu quantificar os carotenoides α -caroteno, o β -caroteno, licopeno, luteína, a zeaxantina e β -criptoxantina nas amostras de frutos e produtos derivados, frutos hortícolas, cogumelos e leguminosas. De acordo com os resultados obtidos para o material de referência interno, podemos concluir que o método analítico nas condições utilizadas no laboratório teve um bom desempenho para o α -caroteno, o β -caroteno e licopeno.

Em relação aos resultados obtidos para as amostras de frutos analisadas, a salada de frutas apresentou os maiores teores de α -caroteno (0,019 mg/100 g), β -caroteno (0,089 mg/100 g) e licopeno (0,18 mg/100 g), a amostra de uvas, o teor mais elevado de luteína (0,057 mg/100 g) e a laranja os teores máximos de zeaxantina (0,055 mg/100 g) e β -criptoxantina (0,056 mg/100 g). Quanto aos produtos hortícolas, a luteína esteve presente em todas as amostras ao contrário da β -criptoxantina que não foi detetada em nenhuma das amostras. A cenoura apresentou os teores mais elevados de α -caroteno (5,7 mg/100 g) e β -caroteno (8,9 mg/100 g), máximo teor de luteína foi quantificado nas amostras de nabiças (7,5 mg/100 g), o licopeno só foi quantificado na amostra de tomate (3,2 mg/100 g) e os pimentos revelaram os teores mais elevados de zeaxantina (0,21 mg/100 g).

De acordo com os resultados obtidos em geral os produtos hortícolas foram mais ricos em carotenoides do que os frutos. No entanto os frutos apresentaram uma maior diversidade de carotenoides, sendo que a β -criptoxantina não esteve presente em qualquer nos produtos hortícolas analisados. Por outro lado, apesar dos frutos conterem em geral um teor inferior de carotenoides totais foram em geral consumidos em maior quantidade que os produtos hortícolas. Assim, será necessário combinar os teores de carotenoides obtidos neste trabalho com os do consumo para se avaliar se a ingestão de carotenoides pela população portuguesa será superior através dos frutos ou dos produtos hortícolas.

O estudo do efeito da sazonalidade nas amostras de frutos e produtos hortícolas permitiu concluir que:

- É importante analisar os alimentos nas diferentes estações do ano, uma vez que este estudo evidenciou que o teor de carotenoides nos frutos e produtos hortícolas poderá variar com a estação do ano, e, por conseguinte, a sua ingestão pela população portuguesa.
- De acordo com os resultados obtidos, a variação no teor em carotenoides ao longo do ano foi claramente mais acentuada para a salada de frutas, uvas, a laranja, a maçã, a pera, os figos secos, o melão, a meloa, o tomate, batatas, a alface, o pimento e o feijão-verde, cenoura, nabiças, tomate e batatas.
- Os alimentos para os quais o teor de carotenoides não variou significativamente para as duas estações do ano (primavera e verão) foram os brócolos, os grelos e a couve-flor.
- De acordo com o intervalo de variação dos teores em carotenoides ao longo das estações do ano, para todas as amostras analisadas, verificou-se um maior intervalo de variação no teor em β -caroteno na estação da primavera (0,040-8,2 mg/100 g) e um menor intervalo na zeaxantina (0,029-0,02 mg/100 g).
- De acordo com os resultados obtidos nos frutos, ao longo do ano, encontraram-se teores superiores de β -caroteno na primavera (0,040-8,2 mg/100 g), de licopeno no outono (0,0038-0,18 mg/100 g) e de luteína no verão (0,0088-0,057 mg/100 g). Nos produtos hortícolas, à excepção da batata, os estudos de sazonalidade envolveram apenas duas estações do ano (primavera e verão) e mostraram teores de α -caroteno e licopeno superiores no verão (0,051-5,7 e 3,2 mg/100 g respectivamente) e de β -caroteno e luteína superiores na primavera (0,0040-8,2 e 0,020-7,5 mg/ 100 g, respetivamente).

Para as estações do ano estudadas e de acordo com o teor total de carotenoides nos alimentos, estes foram mais vantajosos nas seguintes épocas:

- Uvas, melão, tomate, alface, cenouras e feijão-verde-verão
- Laranja, figos secos, meloa, nabiças e pimentos-primavera
- Salada de frutas e maçã – outono
- Pera- inverno
- Batata, brócolos, grelos e couve-flor-primavera/verão

Pela determinação do teor total de carotenoides nas diversas amostras, foi possível concluir que a cenoura continha a maior quantidade de carotenoides disponíveis (15 mg/100 g) enquanto que a pera apresentou o menor teor total de carotenoides (0,01 mg/100 g).

Para todos os alimentos analisados e comparados em que se verificou a influência da sazonalidade, à excepção da alface, da meloa e dos pimentos, a época ideal de consumo

de carotenoides coincide com a época recomendada de ingestão dos mesmos de acordo com a informação disponibilizada pelo Anexo 2.

Para as amostras de cogumelos, feijão e feijão-frade analisadas, não foi detetado α -caroteno e β -criptoxantina e o carotenoide predominante nas três amostras foi a luteína que apresentou um teor superior na amostra de cogumelos (0,23 mg/ 100g). Quanto às amostras de passas de uvas e tarte de frutas, os carotenoides predominantes foram a zeaxantina e a luteína sendo que a amostra de tarte de frutas apresentou um maior teor em luteína (0,16 mg/100 g).

O trabalho desenvolvido no âmbito desta tese foi apresentado, sob forma de comunicação em painel, 8ª Reuniao Anual do PortFIR, realizada no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge em 2015. O painel intitulava-se “Influencia da sazonalidade no teor de carotenoides em frutos”, apresenta-se no anexo 10 e o resumo pode ser consultado no livro de resumos da 8ª Reunião Anual Portifr, pag 10.

7. Proposta de trabalho futuro

Para a continuação deste trabalho apresentam-se a seguir algumas sugestões:

- Avaliar o teor de carotenoides em produtos hortícolas, pela população, nas diferentes estações do ano. Posteriormente será necessário combinar os teores nestes alimentos e nos restantes que constituem a dieta total da população com o seu consumo.
- Estudar outras matrizes alimentares inseridas no projeto TDSExposure que possam contribuir significativamente para a ingestão de carotenoides pela população portuguesa, nomeadamente, alimentos derivados dos frutos (ex: doces de fruta, tartes de fruta) e produtos hortícolas (ex: sopas de legumes, saladas), já que estes são as principais fontes de carotenoides na alimentação humana.

8. Referências Bibliográficas

- Agarwal S., Rao A.V. (2000), *Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases*. CMAJ, 163(6), pp.739-744;
- Aherne S.A., Jiwan M.A., Daly T., O'Brien N.M. (2009), *Geographical Location has Greater Impact on Carotenoid Content and Bioaccessibility from Tomatoes than Variety*. Journal of Plant Foods for Human Nutrition, 64, pp.250-256;
- Amorim-Carrilho K.T., Cepeda A., Fente C., Regal P. (2014), *Review of methods for analysis of carotenoids*. Trends in Analytical Chemistry, 56, pp.49-73;
- Augustynska D., Jemiola-Rzemińska M., Burda K., Strzalka K. (2015), *Influence of polar and nonpolar carotenoids on structural and adhesive properties of model membranes*. Chemico-Biological Interactions, 239, pp.19-25;
- Azevedo C.H., Rodriguez-Amaya D.B. (2005), *Carotenoid composition of kale as influenced by maturity, season and minimal processing*. Journal of Science of Food and Agriculture, 85, p. 591-597;
- Azevedo-Meleiro C.H., Rodriguez-Amaya D.B. (2005), *Carotenoids of endive and New Zealand spinach as affected by maturity, season and minimal processing*. Journal of Food Composition and Analysis, 18, pp. 845-855;
- Barba A., Hurtado M., Mata M., Ruiz V., Tejada M. (2006), *Application of a UV-vis detection: HPLC method for a rapid determination of lycopene and β -carotene in vegetables*. Food Chemistry, 95, pp. 328-336;
- Barros L., Cruz Telma., Baptista P., Ruiz V., Estevinho L.M., Ferreira I.C.F.R. (2008), *Wild and commercial mushrooms and source of nutrients and nutraceuticals*. Food and Chemical Toxicology, 46, pp. 2742-2747;
- Beltrán-González F., Pérez-Lopez A., López-Nicolás J.M., Barrachina A.C. (2008), *Effect of agricultural practice on instrumental colour, mineral content, carotenoid composition, and sensory quality of mandarin orange juice, cv. Hernandina*. Journal of Science of Food and Agriculture, 88, pp. 1731-1738;
- Bendich A., Olson J.A. (1989), *Biological actions of carotenoids*. The FASEB Journal, 3, pp.1927-1932;
- Bendich A. (2013), *Carotenoids and Human Health*. 1st ed. New York, pp.3-317;

- Bernstein P., Li B., Vachali P., Gorusupudi A., Shyam R., Henriksen B., Nolan, J. (2016), *Lutein, zeaxanthin, and meso-zeaxanthin: The basic and clinical science underlying carotenoid-based nutritional interventions against ocular disease*. Progress in Retinal and Eye Research, 50, pp.34-66;
- Bhardwaj S. K., Dwivedi K., Agarwal D. D. (2015), *A Review: HPLC Method Development and Validation*. International Journal of Analytical and Bioanaly, 5(4), pp.76–81;
- Bijttebier S., D'Hondt E., Noten B., Hermans N., Apers S., Voorspoels S. (2014), *Ultra high performance liquid chromatography versus high performance liquid chromatography: Stationary phase selectivity for generic carotenoid screening*. Journal of Chromatography A, 1332, pp.46-56.
- Boeke C., Tamimi R., Berkey C., Colditz G., Eliassen A., Malspeis S., Willett W., Frazier A. (2014), *Adolescent Carotenoid Intake and Benign Breast Disease*. Pediatrics Volume, 133(5), pp.1292-1298;
- Bohoyo-Gil D., Dominguez-Valhondo D., García-parra J.J., González-Gómez D. (2012), *UHPL as a suitable methodology for the analysis of carotenoids in food matrix*. European Food Research and Technology, 235, pp.1055-1061;
- Bramley P. (2000), *Is lycopene beneficial to human health?* Phytochemistry, 54(3), pp.233-236;
- Bray F., Jemal A., Grey N., Ferlay J., Forman D. (2012), *Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study*. 1st ed, pp.790-801;
- Britton G. (1995), *Structure and properties of carotenoids in relation to function*. The FASEB Journal, 9, pp.1551-1558;
- Bunea C.I., Pop N., Babes A.C., Matea C., Dulf V.D., Bunea A. (2012), *Carotenoids, total polyphenols and antioxidant activity of grapes (Vitis vinifera) cultivated in organic and conventional systems*. Chemistry Central Journal, 6:66, pp.1-9;
- Burri B. (2015), *Beta-cryptoxanthin as a source of vitamin A*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 95(9), pp.1786-1794;
- Burri B., La Frano M., Zhu C. (2016), *Absorption, metabolism, and functions of β -cryptoxanthin*. Nutrition Reviews, 74(2), pp.69-82;

Cacciola F., Donato P., Sciarrone D., Dugo P., Mondello L. (2016), *Comprehensive Liquid Chromatography and Other Liquid-Based Comprehensive Techniques Coupled to Mass Spectrometry in Food Analysis*. Analytical Chemistry, pp.1-52;

Castenmiller J., West C. (1998), *Bioavailability and Bioconversion of Carotenoids*. Annual Review of Nutrition, 18(1), pp.19-38;

Cervantes-Paz B., Victoria-Campos C., Ornelas-Paz J. (2016), *Absorption of Carotenoids and Mechanisms Involved in Their Health-Related Properties*. In: *Carotenoids in Nature*. Subcellular Biochemistry, 79, pp.415-454;

Chauveau-Duriot B., Doreau M., Nozière P., Graulet B. (2010), *Simultaneous quantification of carotenoids, retinol, and tocopherols in forages, bovine plasma, and milk: validation of a novel UPLC method*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 397(2), pp.777-790;

Chucair A.J., Rotstein N.P., SanGiovanni J.P., During A., Chew E.Y., Politi L.E. (2007), *Lutein and zeaxanthin protect photoreceptors from apoptosis induced by oxidative stress: relation with docosahexaenoic acid*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 48 (11), pp. 5168-5177;

Cooperstone, J.L., Schwartz, S.J. (2016), *Recent Insights Into Health Benefits of Carotenoids*. *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages: Industrial Applications for Improving Food Color*. Woodhead Publishing, pp. 473-497;

Cortez L., Diniz A.A, Ramos A.P, Almeida A.C., Rolo A., Trancoso A. *et al.* (1996), *Validação de Resultados em Laboratórios Químicos*. Guia Relacre nº 3, Edição 1, pp.1-47;

Courraud J., Berger J., Cristol J., Avallone S. (2013), *Stability and bioaccessibility of different forms of carotenoids and vitamin A during in vitro digestion*. Food Chemistry, 136, pp. 871-877;

Cruz A. (2004), *Guia introdutório à incerteza da Medição*. IPQ, pp.1-18;

Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN) (2012), *Determinação do teor de carotenoides por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)*, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge;

Dias M.G., Camões M.F.G.F.C., Oliveira L. (2008), *Uncertainty estimation and inhouse method validation of HPLC analysis of carotenoids for food composition data production*, Food Chemistry, 109, pp. 815-824;

- Dias M.G., Camões M.F.G.F.C., Oliveira L. (2009), *Carotenoids in traditional portuguese fruits and vegetables*, Food Chemistry, 113, pp. 808-815;
- Donhowe E., Flores F., Kerr W., Wicker L., Kong F. (2014), *Characterization and in vitro bioavailability of β -carotene: Effects of microencapsulation method and food matrix*. Food Science and Technology, 57(1), pp.42-48;
- Dugo P., Giuffrida D., Herrero M., Donato P., Mondello L. (2009), *Epoxycarotenoids esters analysis in intact orange juices using two-dimensional comprehensive liquid chromatography*. Journal of Separation Science, 32(7), pp.973-980;
- Englberger L., Wills R.B.H., Blades B., Dufficy L., Daniells J.W., Coyne T. (2006), *Carotenoid content and flesh color of selected banana cultivars growing in Australia*. Food and Nutrition Bulletin, 27 (4), pp. 281-291;
- Englberger L., Lorennij R., Taylor M., Tuia V.S., Aalbersberg W., Tibon L. et al. (2013), *Carotenoid content and tradicional knowledge of breadfruit cultivars of the Republic of the Marshall Islands*. Journal of Food Composition and Analysis, pp.1-8;
- Erdman, J., Ford, N. and Lindshield, B. (2009), *Are the health attributes of lycopene related to its antioxidant function?* Archives of Biochemistry and Biophysics, 483(2), pp.229-235;
- Fernández-García E., Carvajal-Lérida I., Jarén-Galán M., Garrido-Fernández J., Pérez-Gálvez A., Hornero-Méndez D. (2012), *Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities*. Food Research International, 46(2), pp.438-450;
- Fiedor J., Burda K. (2014), *Potencial Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease*. Nutrients, 6, pp.466-488;
- Finkel'shtein E. (2016), *Modern Methods of Analysis of Carotenoids (Review)*. Pharmaceutical Chemistry Journal, 50(2), pp.96-107;
- Fish W. (2012), *Refinements of the attending equations for several spectral methods that provide improved quantification of β -carotene and/ or lycopene in selected foods*. Postharvest Biology and Technology, 66, p. 16-22;
- Fraser P.D., Truesdale M.R., Bird C.R., Schuch W., Bramley P. M. (1994), *Carotenoid Biosynthesis during Tomato Fruit Development*. Plant Physiol, 105, p. 405-413;
- Frenich A.G., Torres M.E.H., Vega A.B., Vidal J.L.M., Bolaños P.P. (2005), *Determination of Ascorbic Acid and Carotenoids in Food Commodities by liquid*

Chromatography with Mass Spectrometry Detection. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, p. 7371-7376;

Gammone M., Riccioni G., D'Orazio N. (2015), *Carotenoids: potential allies of cardiovascular health?* Food & Nutrition Research 2015, 59: 26762, pp.1-11;

Garrett D., Failla M., Sarama R. (1999), *Development of an in Vitro Digestion Method To Assess Carotenoid Bioavailability from Meals*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(10), pp.4301-4309;

Gerster H. (1997), *The potential role of lycopene for human health*. The Journal of the American College of Nutrition, 16, pp.109-126;

Granado-Lorencio F., Olmedilla-Alonso B., Herrero-Barbudo C., Blanco-Navarro I., Pérez-Sacristán B., Blázquez-García S. (2007), *In vitro bioaccessibility of carotenoids and tocopherols from fruits and vegetables*. Food Chemistry, 102(3), pp.641-648;

Guia ISO/IEC 99 (2008), *Vocabulário Internacional de Metrologia*, Instituto Português da Qualidade;

Guia para a Quantificação de Incerteza em Ensaios Químicos, Instituto Português da Acreditação (IPAC) (2007);

Gupta P., Sreelakshmi Y., Sharma R. (2015), *A rapid and sensitive method for determination of carotenoids in plant tissues by high performance liquid chromatography*. Plant Methods, 11(1), pp.1-12;

Gupta V., Jain A.D.K., Gill N.S., Gupta K. (2012), *Development and Validation of HPLC Method - a Review*. International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences, 2(4), pp.17–25;

Halliwel B. (1996), *Antioxidants in Human Health and Disease*. Annual Review of Nutrition, 16(1), pp.33-50;

Hart D.J, Scott K.J. (1995), *Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK*. Food Chemistry, 54, pp.101-111;

Heinonen M., Ollilainen V., Linkola E., Varo P., Koivistoinen P. (1989), *Carotenoids in Finnish foods: vegetables, fruits, and berries*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 37(3), pp.655-659;

- Hempel J., Schädle C.N., Leptihn S., Carle R., Schweiggert R.M. (2016), *Structure related aggregation behavior of carotenoids and carotenoid esters*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 317, pp.161-174;
- Howitt C. A., Pogson B.J. (2006), *Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues*. Plant, cell and Environment, 29, pp. 435-445;
- Hrvolová, B., Martínez-Huélamo, M., Colmán-Martínez, M., Hurtado-Barroso, S., Lamuela-Raventós, R. and Kalina, J. (2016). *Development of an Advanced HPLC–MS/MS Method for the Determination of Carotenoids and Fat-Soluble Vitamins in Human Plasma*. International Journal of Molecular Sciences, 17(10), pp.1-17;
- Irakli M., Samanidou V., Papadoyannis I. (2011), *Development and validation of an HPLC method for the simultaneous determination of tocopherols, tocotrienols and carotenoids in cereals after solid-phase extraction*. Journal of Separation Science, 34(12), pp.1375-1382;
- Irakli M., Chatzopoulou P., Kadoglidou K., Tsivelika N. (2016), *Optimization and development of a high-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of vitamin E and carotenoids in tomato fruits*. Journal of Separation Science, 39(17), pp.3348-3356;
- Johnson E.J. (2002), *The role of carotenoids in human health*. Nutrition in Clinical Care 5(2), pp. 57–65;
- Kandlakunta B., Rajendran A., Thingnganing L (2008), *Carotene content of some common (cereals, pulses, vegetables, spices and condiments) and unconventional sources of plant origin*. Food Chemistry, 106(1), pp.85-89;
- Kaulmann A., Jonville M., Schneider Y., Hoffmann L., Bohn T. (2014), *Carotenoids, polyphenols and micronutrient profiles of Brassica oleraceae and plum varieties and their contribution to measures of total antioxidant capacity*. Food Chemistry, 155, pp.240-250;
- Kim H.J., Park W.S., Bae J.Y., Kang S.Y., Yang M.H., Lee S., Lee H.S. et al. (2015), *Variation in the carotenoid and anthocyanin content of Korean cultural varieties and home-processed sweet potatoes*. Journal of Food Composition and Analysis, pp.1-6;
- Kimura M., Rodriguez-Amaya D.B. (2003), *Carotenoid Composition of Hydroponic Leafy Vegetables*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(9), pp. 2603-2607;

Kiokias S., Varzakas T. (2016), *HPLC Analysis and Determination of Carotenoid Pigments in Commercially Available Plant Extracts*. Current Research in Nutrition and Food Science Journal, 4(1), pp.01-14;

Kohlmeier L., Kark J., Gomez-Gracia E., Martin B., Steck S., Kardinaal A., Ringstad J., Thamm M., Masaev V., Riemersma R., Martin-Moreno J., Huttunen J., Kok F. (1997), *Lycopene and Myocardial Infarction Risk in the EURAMIC Study*. American Journal of Epidemiology, 146(8), pp.618-626;

Kopec R.E., Cooperstone J.L, Cichon M.J., Schwartz S.J. (2012), *Analysis Method of Carotenoids*. Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals. First Edition, pp. 105-148;

Krinsky N.I., Johnson E.J. (2005), *Carotenoid actions and their relation to health and disease*. Molecular Aspects of Medicine, 26(6), pp. 459–516;

Kumar V., Bharadwaj R., Gupta G., Kumar S. (2015), *An Overview on HPLC Method Development, Optimization and Validation Process for Drug Analysis*, The Pharmaceutical and Chemical Journal, 2(2), pp. 30–40;

Lee C.M., Boileau A.C., Boileau T.W.M., Williams A.W., Swanson K.S., Heintz K.A., Erdman J.W. (1999), *Review of animal models in carotenoid research*. Journal of Nutrition, 129, pp. 2271-2277;

Lefsrud M., Kopsell D., Wenzel A., Sheehan J. (2007), *Changes in kale (Brassica oleracea L.var.acephala) carotenoid and chlorophyll pigment concentrations during leaf ontogeny*. Scientia Horticulturae, 112, pp. 136–141;

Lemmens L., Colle I., Van Buggenhout S., Palmero P., Van L.A., Hendrickx M. (2014). *Carotenoid bioaccessibility in fruit- and vegetable-based food products as affected by product (micro)structural characteristics and the presence of lipids: A review*. Trends in Food Science & Technology, 38, pp.125-135;

Lester G.E., Buslig J.A.M.B. (2007), *Organic vs Conventionally Grown Rio Red Whole Grapefruit and Juice: Comparison of Production Inputs, Market Quality, Consumer Acceptance, and Human Health-Bioactive Compounds*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, pp. 4474-4480;

Li Y., Fabiano-Tixier A., Tomao V., Cravotto G., Chemat F. (2013), *Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids based on the bio-refinery concept using sunflower oil as an alternative solvent*. Ultrasonics Sonochemistry, 20(1), pp.12-18;

Lu Q.Y., Zhang Y., Wang Y., Wang D., Lee R.P., Gao K., Byrns R., Heber D. (2009), *California Hass Avocado: Profiling of Carotenoids, Tocopherol, Fatty Acid, and Fat*

Content during Maturation and from Different Growing Areas. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(21), pp.10408–10413;

Machmudah S., Goto M. (2013), *Methods for Extraction and Analysis of Carotenoids*. Natural Products, 1st ed. Berlin: Springer, pp.3367-3407;

Maiani G., Castón M., Catasta G., Toti E., Cambrodón I., Bysted A. et al. (2009), *Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans*. Mol.Nutr.Food Res, 53, pp. 1-25;

Majeed M., Nagabhushanam K., Choudhur A. (2016), *Antioxidants: Balancing the Good, the Bad and the Ugly*. Nutrition and Food Technology: Open Access, 2(2), pp.1-4;

Martínez-Valverde I., Periago M.J., Provan G., Chesson A. (2002), *Phenolic compounds, lycopene, and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (Lycopersicum esculentum)*. Journal of Science of Food and Agriculture, 82, pp. 323-330;

Mathiasson L., Turner C., Berg H., Dahlberg L., Theobald A., Anklam E., Ginn R., Sharman M., Ulberth F., Gabernig R. (2002), *Development of methods for the determination of vitamins A, E and β -carotene in processed foods based on supercritical fluid extraction: a collaborative study*. Food Additives and Contaminants, 19(7), pp.632-646;

Matsubara A., Uchikata T., Shinohara M., Nishiumi S., Yoshida M., Fukusaki E., Bamba T. (2012). Highly sensitive and rapid profiling method for carotenoids and their epoxidized products using supercritical fluid chromatography coupled with electrospray ionization-triple quadrupole mass spectrometry. Journal of Bioscience and Bioengineering, 113(6), pp.782-787;

Meléndez-Martínez A.J., Britton G., Vicario I.M., Heredia F.J. (2007), *Review: Analysis of carotenoids in orange juice*. Journal of Food Composition and Analysis, pp. 638-649;

Meléndez-Martínez A.J., Escudero-Gilete M.L., Vicario I.M., Heredia F.J. (2010), *Study of influence of carotenoids structure and individual carotenoids in the qualitative and quantitative attributes of orange juice color*. Journal of Food Research International, 43, pp.1289-1296;

Mellado-Ortega E., Hornero-Méndez D. (2015), *Carotenoids in cereals: an ancient resource with presente and future applications*. Phytochem Rev 14(6), pp. 873-890;

Mercadante A.Z., Rodriguez-Amaya D.B. (1991), *Carotenoid Composition of Leafy Vegetable in Relation to Some Agricultural Variables*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39, pp.1094-1097;

Mercadante A.Z., Rodriguez-Amaya D.B. (1998), *Effect of Ripening, Cultivar Differences, and Processing on the Carotenoid Composition of Mango*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, pp.128-130;

Mezzomo N., Ferreira S.R.S. (2016), *Carotenoids Functionality, Sources, and Processing by Supercritical Technology: A Review*. Journal of Chemistry, pp.1-16.

Murillo A., Fernandez M. (2016), *Potential of Dietary Non-Provitamin A Carotenoids in the Prevention and Treatment of Diabetic Microvascular Complications*. Advances in Nutrition: An International Review Journal, 7(1), pp.14-24;

Murillo E., Meléndez-Martínez A.J., Portugal F. (2010), *Screening of vegetables and fruits from Panama for rich sources of lutein and zeaxanthin*. Food Chemistry, 122, pp. 167-172;

Murillo E., Giuffrida D., Menchaca D., Dugo P., Torre G., Meléndez-Martínez A.J., Mondello L. (2013), *Native carotenoids composition of some tropical fruits*. Food Chemistry, 140 (4), pp. 825-836;

Müller H. (1997), *Determination of the carotenoid content in selected vegetables and fruit by HPLC and photodiode array detection*. Z Lebensm Unters Forsch A, 204, pp. 88-94;

Nwachukwu, I., Udenigwe, C. and Aluko, R. (2015), *Lutein and zeaxanthin: Production technology, bioavailability, mechanisms of action, visual function, and health claim status*. Trends in Food Science & Technology, pp.1-28;

O'Connell, O., Ryan, L. and O'Brien, N. (2007). *Xanthophyll carotenoids are more bioaccessible from fruits than dark green vegetables*. Nutrition Research, 27(5), pp.258-264;

Oliveira C., Barbosa A., Ferreira A.C.S., Guerra J., Pinho A.P.G. (2006), *Carotenoid profile in grapes related to aromatic compounds in wines from Douro region*. Journal of food science, 71 (1), pp. 31-37;

Oliver J., Palou A. (2000), *Chromatographic determination of carotenoids in foods*. Journal of Chromatography A, 881, pp. 543-555;

- Omenn G.S. (1998), Chemoprevention of lung cancer: The rise and demise of betacarotene. *Annual Review of Public Health*, 19, pp. 73-99;
- Paiva S., Russell R. (1999), *Beta carotene and other carotenoids as antioxidants*. *Journal of the American College of Nutrition*, 18, pp. 426–433;
- Panic N., Pastorino R., Boccia S., Leoncini E. (2016). *Carotenoid intake from natural sources and colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies*. *European Journal of Cancer Prevention* 2016, pp.1-11;
- Pannellini T., Lezzi M., Liberatore M., Sabatini F., Lacobelli S., Rossi C., Alberti S., Di Ilio C., Vitaglione P., Fogliano V., Piantelli M. (2010), *A Dietary Tomato Supplement Prevents Prostate Cancer in TRAMP Mice*. *Cancer Prevention Research*, 3(10), pp.1284-1291;
- Parada J., Aguilera J.M. (2007), *Food Microstructure Affects the Bioavailability of Several Nutrients*. *Journal of Food Science*, 72, pp. 21–32;
- Peto, R., Doll, R., Buckley, J. and Sporn, M. (1981). *Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates?* *Nature*, 290(5803), pp.201-208;
- Petyaev, I. (2016), *Lycopene Deficiency in Ageing and Cardiovascular Disease*. Hindawi Publishing Corporation, pp.1-6;
- Quirós A.R.B., Costa H.S. (2006), *Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: a review*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, pp. 97-111;
- Raffo A., Malfa G.L., Fogliano V., Maiani G., Quaglia G., (2006), *Seasonal variations in antioxidant components of cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* cv, Naomi F1)*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, pp. 11-19;
- Rao A., Agarwal S. (1999), *Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: A review*. *Nutrition Research*, 19(2), pp.305-323;
- Rao A.V., Rao L.G. (2007), *Carotenoids and human health*. *Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 55 (3), pp. 207-216;
- Reboul E., Richelle M., Perrot E., Desmoulins-Malezet C., Pirisi V., Borel P. (2006), *Bioaccessibility of Carotenoids and Vitamin E from Their Main Dietary Sources*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), pp.8749-8755;
- Ried K., Fakler P. (2011), *Protective effect of lycopene on serum cholesterol and blood pressure: Meta-analyses of intervention trials*. *Maturitas*, 68(4), pp.299-310;

Rivera S., Canela-Garayoa R. (2012), *Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials*. Journal of Chromatography A, 1224, pp.1-10;

Rodriguez-Amaya D.B. (1997), *Carotenoids and Food Preparation: The Retention of Provitamin A Carotenoids in Prepared, Processed, and Stored Food*. Office of Health and Nutrition, Bureau for Global Programs, Field Support and Research, U.S. Agency for International Development;

Rodriguez-Amaya D.B. (2001), *A guide to carotenoid analysis in foods*, ILSI Press, pp.1-64;

Rodriguez-Amaya D., Kimura M. (2004). *HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis*. 1st ed. Washington, DC and Cali: HarvestPlus, pp.2-58;

Rodriguez-Amaya, D.B., Rodriguez E.B., Amaya- Farfan J. (2006), *Advances in Food Carotenoid Research: Chemical and Technological Aspect, Implications in Human Health*. Malaysian Journal of Nutrition, 12(1), pp. 101-121;

Rodriguez-Amaya, D.B., Kimura M., Godoy H.T., Amaya-Farfan J. (2008), *Update Brazilian database on food carotenoids: factors affecting carotenoid composition*. Journal of Food Composition and Analysis, 21, pp 445-463;

Rodrigues-Amaya D.B. (2010), *Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids: A review*. Journal of Food Composition and Analysis, 23, p. 726-740;

Rodriguez-Amaya, D. (2015), *Status of carotenoid analytical methods and in vitro assays for the assessment of food quality and health effects*. Current Opinion in Food Science, 1, pp.56-63;

Rodrigues-Amaya D.B. (2016), *Natural food pigments and colorants*. Current Opinion in Food Science, 7, pp. 20-26;

Rouseff R.L., Sadler George D., Putnam T.J, Davis J.E. (1992), *Determination of β -Carotene and Other Hydrocarbon Carotenoids in Red Grapefruit Cultivars*. Journal Agric.Food Chem, 40 (1), pp. 47-51;

Saini, R.K. & Keum, Y.S. (2016), *Tocopherols and tocotrienols in plants and their products: A review on methods of extraction, chromatographic separation, and detection*. Food Research International 2016, pp.1-52;

Sajilata M.G., Singhal R.S., Kamat M.Y. (2008), *The Carotenoid Pigment Zeaxanthin – A Review*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 7, pp. 29-49;

- Sander L., Sharpless K., Pursch M. (2000), *C30 Stationary phases for the analysis of food by liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 880(1-2), pp.189-202;
- Silva M.M.M. (2014), *Contributo para a determinação simultânea, por cromatografia líquida de alta resolução, de carotenoides, vitamina A e vitamina E em amostras compostas por diferentes matrizes alimentares*. Tese de Mestrado, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa;
- Singh J., Upadhyay A.K., Prasad K., Bahadur A., Rai M. (2007), *Variability of carotenes, vitamin C, E and phenolics in Brassica Vegetables*. Journal of Food Composition and Analysis, 20(2), pp. 106-112;
- Spanos G., Chen H., Schwartz S. (1993), *Supercritical CO₂, Extraction of β -Carotene from Sweet Potatoes*. Journal of Food Science, 58(4), pp.817-820;
- Stahl W., Sies H. (1996), *Perspectives in Biochemistry and Biophysics Lycopene: A Biologically Important Carotenoid for Humans?* Archives of Biochemistry and Biophysics, 336(1), pp.1-9.
- Stahl W., Sies H. (2003), *Antioxidant activity of carotenoids*. Molecular Aspects of Medicine 24, pp. 345-351;
- Stahl W., Sies H. (2005), *Bioactivity and protective effects of natural carotenoids*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 1740(2), pp.101-107;
- Stinco C., Fernández-Vázquez R., Escudero-Gilete M., Heredia F., Meléndez-Martínez A., Vicario I. (2012), *Effect of Orange Juice's Processing on the Color, Particle Size, and Bioaccessibility of Carotenoids*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60(6), pp.1447-1455;
- Su Q., Rowley K.G., Itsiopoulos C., O'Dea K. (2002), *Identification and quantification of major carotenoids in selected componentes of the Mediterranean diet: green leafy vegetables, figs and olive oil*. European Journal of Clinical Nutrition, 56, pp. 1149-1154;
- Sun H., Ge X., Lv Y., Wang, A. (2012). *Application of accelerated solvent extraction in the analysis of organic contaminants, bioactive and nutritional compounds in food and feed*. Journal of Chromatography A, 1237, pp.1-23;
- Tanaka T., Shnimizu M., Moriwaki H. (2012), *Cancer chemoprevention by carotenoids*, Molecules 17, pp. 3202-3242;

Tapiero H., Townsend D., Tew K. (2004), *The role of carotenoids in the prevention of human pathologies*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 58(2), pp.100-110;

Thakkar, S. and Failla, M. (2008), *Bioaccessibility of Pro-Vitamin A Carotenoids Is Minimally Affected by Non Pro-Vitamin A Xanthophylls in Maize (Zea maysssp.)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(23), pp.11441-11446;

Van Buggenhout S., Alminger M., Lemmens L., Colle I., Knockaert G., Moelants K., Van Loey A., Hendrickx M. (2010), *In vitro approaches to estimate the effect of food processing on carotenoid bioavailability need thorough understanding of process induced microstructural changes*. Trends in Food Science & Technology, 21(12), pp.607-618;

Van den Berg, H., Faulks, R., Granado, H., Hirschberg, J., Olmedilla, B., Sandmann, G., Southon, S. and Stahl, W. (2000), *The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80(7), pp.880-912;

Vargas-Murga L., Rosso V.V., Mercadante A.Z., Olmedilla-Alonso B., (2008-2009), *Fruits and vegetables in the Brazilian Household Budget Survey: Carotenoid content and assessment of individual carotenoid intake*. Journal of Food Composition and Analysis, 36, pp. 1-35;

Verrijssen T., Balduyck L., Christiaens S., Van Loey A., Van Buggenhout S., Hendrickx M. (2014), *The effect of pectin concentration and degree of methyl-esterification on the in vitro bioaccessibility of β -carotene-enriched emulsions*. Food Research International, 57, pp.71-78;

Wall M.M. (2006), *Ascorbic acid, vitamin A, and mineral composition of banana (Musa sp.) and papaya (Carica papaya) cultivars grown in Hawaii*. Journal of Food Composition and Analysis, 19, pp. 434-445;

Walsh R., Bartlett H., Eperjesi F. (2015), *Variation in Carotenoid Content of kale and Other Vegetables: A Review of Pre- and Post-harvest Effects*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63, pp. 9677-9682;

WHO (2016), Cancer, World Health Organization, consultado em 23 de outubro de 2016; <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>;

Xavier A. A. O, Pérez-Gálvez A. (2016), *Carotenoids as a Source of Antioxidants in the Diet*. In: *Carotenoids in Nature*. Subcellular Biochemistry, 79, pp.359-375;

Yadav U., Rani V., Deep G., Singh R., Palle K. (2016), *Oxidative Stress in Metabolic Disorders: Pathogenesis, Prevention, and Therapeutics*. Hindawi Publishing Corporation, pp.1-3;

Yahia E.M. (2010), *Fruit and Vegetable Phytochemicals Chemistry, Chemistry, Stability, and Biological Actions of Carotenoids: The Contribution of Fruit and Vegetable Consumption to Human Health*. 1st ed. New Delhi, India: A John Wiley & Sons, Inc., Publication, pp.3-52;

Yoshihara D., Fujiwara N., Suzuki K. (2010), *Antioxidants: Benefits and risks for long-term health*. *Maturitas*, 67(2), pp.103-107;

Young A.J., Frank H.A. (1996), *Energy transfer reactions involving carotenoids: quenching of chlorophyll fluorescence*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 36, pp. 3-15;

Young, A., Lowe, G. (2001), *Antioxidant and Prooxidant Properties of Carotenoids*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385(1), pp.20-27;

Yunusa U., Attah C. (2016), *Vitamin A and Immunity: A Review*. *Chemistry Research Journal*, 1(1), pp.44-49;

Zeb A., Mehmood S. (2004), *Carotenoids Contents from Various Sources and Their Potential Health Applications*. *Pakistan Journal of Nutrition* 3 (3), pp. 199-204;

ANEXOS

Anexo 1

Tabela A.1- Composição em carotenoides reportada por diversos autores para amostras recolhidas em diferentes estações do ano.

Referência	Amostra	Variedade	Estação do ano	Carotenoides (mg/100g)	Localização
<i>Azevedo et. al (2005)</i>	Couve	<i>Manteiga</i>	Verão	β -Caroteno (3,4 \pm 0,57) Luteína (5,24 \pm 0,36)	---
			Inverno	β -Caroteno (3,33 \pm 0,18) Luteína (4,44 \pm 0,21)	
<i>Muller et. al (1997)</i>	Tomate	<i>Não especificado</i>	Inverno	α -Caroteno (0,15) β -Caroteno (0,61) β -Criptoxantina (0,36) Luteína (0,09) Licopeno (3,02)	---
	Tomate (estufa)	<i>Não especificado</i>	Inverno	β -Caroteno (0,20) β -Criptoxantina (0,011) Luteína (1,33)	
<i>Dias et al. (2009)</i>	Couve Galega	<i>Var.acephala DC.</i>	Junho	β -Caroteno (2,6) Luteína (3,7)	---
	Couve Galega	<i>Var.acephala DC.</i>	Outubro	β -Caroteno (4,2) Luteína (5,9)	
	Couve Galega	<i>Var.acephala DC.</i>	Dezembro	β -Caroteno (6,4) Luteína (7,2)	
<i>Heinonen et al. (1989)</i>	Tomate	<i>Não especificado</i>	Junho a Agosto	β -Caroteno (0,39-0,58) Luteína + Zeaxantina (0,05-0,11) Licopeno (3,80-6,60)	---
		<i>Não especificado</i>	Outubro a Março	β -Caroteno (0,61-0,85) Luteína + Zeaxantina (0,05-0,10)	

				Licopeno (2,60-3,10)	
	Cenoura	<i>Não especificado</i>	Junho a Agosto	α -Caroteno (2,40-2,90) β -Caroteno (2,60-5,50) Luteína + Zeaxantina (0,260)	---
		<i>Não especificado</i>	Outubro a Março	α -Caroteno (0,53-2,20) β -Caroteno (4,60-7,70) Luteína + Zeaxantina (0,22-0,30)	
	Alface	<i>Não especificado</i>	Junho a Agosto	β -Caroteno (0,73-0,79) Luteína + Zeaxantina (1,20-1,40)	---
		<i>Não especificado</i>	Outubro a Março	β -Caroteno (0,86-1,10) Luteína + Zeaxantina (1,80-2,20)	
<i>Raffo et al.(2006)</i>	Tomate cherry	<i>Pomodoro di Pachino</i>	Abril	β -Caroteno (0,950 \pm 0,024) Licopeno (8,10 \pm 1,40) Luteína (0,017 \pm 0,002)	---
		<i>Pomodoro di Pachino</i>	Junho	β -Caroteno (1,06 \pm 0,033) Licopeno (10,81 \pm 0,078)	
		<i>Pomodoro di Pachino</i>	Julho	β -Caroteno (0,519 \pm 0,030) Licopeno (7,06 \pm 0,27) Luteína (0,025 \pm 0,004)	
		<i>Pomodoro di Pachino</i>	Dezembro	β -Caroteno (0,843 \pm 0,127) Licopeno (10,19 \pm 0,23)	

				Luteína (0,014±0,003)	
		<i>Pomodoro di Pachino</i>	Janeiro	β-Caroteno (0,623±0,035) Licopeno (8,202±0,427) Luteína (0,016±0,006)	
		<i>Pomodoro di Pachino</i>	Março	β-Caroteno (0,820±0,019) Licopeno (11,969±0,218) Luteína (0,020±0,002)	
<i>Martinez-Valverde et al. (2002)</i>	Tomate	<i>Rambo</i>	Primavera	Licopeno (3,19±0,054)	---
		<i>Senior</i>	Primavera	Licopeno (3,22±0,055)	
		<i>Ramilete</i>	Inverno	Licopeno (3,14±0,117)	
		<i>Liso</i>	Verão	Licopeno (1,86±0,100)	
		<i>Pera</i>	Inverno	Licopeno (6,33±0,321)	
		<i>Canario</i>		Licopeno (4,94±0,273)	
		<i>Durina</i>		Licopeno (6,49±0,512)	
		<i>Daniella</i>		Licopeno (3,63±0,35)	
		<i>Remate</i>	Outono	Licopeno (4,29±0,329)	
<i>Lu et al. (2009)</i>	Abacate	<i>Hass</i>	Janeiro	β-Caroteno (0,021±0,003) β-Criptoxantina (0,030±0,005) Luteína (0,372±0,024)	<i>Ventura</i>
			Abril	β-Caroteno (0,056±0,004) β-Criptoxantina (0,018±0,003)	

				Luteína (0,456±0,019)	
			Julho	β-Caroteno (0,058±0,0011) β-Criptoxantina (0,021±0,005) Luteína (0,630±0,070)	
			Setembro	β-Caroteno (0,062±0,005) β-Criptoxantina (0,021±0,002) Luteína (0,803±0,015)	
			Janeiro	β-Caroteno (0,010±0,004) β-Criptoxantina (0,020±0,003) Luteína (0,283±0,027)	
			Abril	β-Caroteno (0,069±0,007) β-Criptoxantina (0,020±0,004) Luteína (0,433±0,024)	<i>San Luis Obispo</i>
			Julho	β-Caroteno (0,088±0,002) β-Criptoxantina (0,025±0,001) Luteína (0,592±0,025)	
			Setembro	β-Caroteno (0,0101±0,007) β-Criptoxantina (0,018±0,002) Luteína (0,842±0,023)	
			Janeiro	β-Caroteno (0,033±0,006) β-Criptoxantina (0,023±0,004) Luteína (0,363±0,004)	
			Abril	β-Caroteno (0,078±0,015) β-Criptoxantina (0,039±0,010) Luteína (0,726±0,104)	<i>San Diego</i>
			Julho	β-Caroteno (0,088±0,003)	

				β -Criptoxantina (0,021 \pm 0,003) Luteína (0,692 \pm 0,096)	
			Setembro	β -Caroteno (0,052 \pm 0,011) β -Criptoxantina (0,018 \pm 0,003) Luteína (0,629 \pm 0,049)	
			Janeiro	β -Caroteno (0,041 \pm 0,007) β -Criptoxantina (0,027 \pm 0,003) Luteína (0,431 \pm 0,029)	
			Abril	β -Caroteno (0,057 \pm 0,005) β -Criptoxantina (0,023 \pm 0,001) Luteína (0,439 \pm 0,018)	Riverside
			Julho	β -Caroteno (0,082 \pm 0,006) β -Criptoxantina (0,017 \pm 0,001) Luteína (0,542 \pm 0,011)	
			Setembro	β -Caroteno (0,059 \pm 0,009) β -Criptoxantina (0,018 \pm 0,002) Luteína (0,602 \pm 0,082)	

Anexo 2

Época mais aconselhável para o consumo de frutos e produtos:

Tabela A.1.1 - Época mais aconselhável para o consumo de frutos. (adaptado de <http://www.deco.proteste.pt/alimentacao/produtos-alimentares/dicas/fruta-legumes-epoca-ideal>).

	Meses											
Frutos	Jan	Fev	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
Uvas												
Laranjas												
Maçã												
Pêra												
Meloa												
Melão												

Tabela A.2.2 - Época mais aconselhável para o consumo de produtos hortícolas. (adaptado de <http://www.deco.proteste.pt/alimentacao/produtos-alimentares/dicas/fruta-legumes-epoca-ideal>).

	Meses											
Produtos Hortícolas	Jan	Fev	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
Batata												
Brócolos												
Tomate												
Alface												
Grelós												
Nabiças												
Cenouras												
Pimentos												
Feijão verde												

Legenda	
Dentro da época	
Fora da época	
Geralmente indisponível	

Anexo 3

Tabela A.3- Métodos cromatográficos reportados na literatura para a determinação de carotenoides em diversas matrizes alimentares.

Amostras analisadas	Analitos	Método Analítico		Ref.
		Procedimento Experimental	Método Utilizado, Fase Móvel e Estacionária	
Acerola, Caqui	β -caroteno, licopeno	1g de amostra triturada com 60 ml de acetona fria seguida de filtração sob vácuo. Evaporação com 50 ml éter de petróleo frio e a uma temperatura de 35-37°C. Carotenoides dissolvidos em 25 ml de éter de petróleo e armazenados (a cerca de 5 C) em frascos de vidro âmbar até ao momento da análise cromatográfica.	Método Utilizado: HPLC-DAD Fase Móvel- MeOH: acetato de etilo: ACN (50:40:10), eluição isocrática Fase estacionária: coluna Phenomenex C18 (250x4,6 mm, 5 μ m) acoplado a uma coluna de ODS (C18, 4,3 mm).	Cardoso, 2011
Abóbora e Damasco	25 carotenoides	1,5 g de amostra + 50 mL de acetona / hexano (1: 1, v / v) contendo BHT (50 mg / 100 mL) e hidroxianisol butilado (50 mg / 100 mL). Extracto filtrado e resíduo lavado com 75 ml de acetato de etilo. Extracto combinado evaporado até à secura em vácuo e resíduo dissolvido em 2-propanol (2 ou 5 ml).	Método Utilizado: HPLC-DAD/MS Fase Móvel:(A) MeOH / MTBE (MTBE) / água (81: 15: 4, v / v / v) (B) MeOH / MTBE / água. Fase estacionaria: Coluna RP C30 (150x3mm, 3 μ m).	Kurz, 2008

Beringela, cenoura, courgette, feijão-verde, quiabo e tomate	Violaxantina, α -caroteno, β -caroteno, zeaxantina, licopeno, luteína, cis-luteína, 9-cis- β -caroteno, 13-cis- β -caroteno,	500 mg de amostra em puré + 10 mL de MeOH durante 1 h numa incubadora com agitação a 120 rpm. Homogeneização durante 30 segundos num banho de gelo e Sonda lavada com MeOH. Centrifugação a 3000 rpm durante 5 min. Extração com 4x10 mL de THF MeOH+ agitação em vórtice + Centrifugação. 1 mL do extracto seco sob azoto + reconstituição em 1 mL de etanol.	Método Utilizado: HPLC-DAD Fase Móvel: (A) MeOH: (MTBE): H ₂ O (85:12:3, p/v) com 1,5% de sol. aq. de acetato de amónio (B) MeOH: MTBE: H ₂ O (8:90:2, p/v) com 1,0% de sol. aq. De acetato de amónio. Fase Estacionária: Coluna YMC C30 (3 μ m, 150 \times 4,6 mm)	El-Qudah, 2009
Cenoura	β -caroteno, carotenos, xantofilas	10 g de amostra+ extração com <i>n</i> -hexano:EtOH 96% (1:1, v/v) até ficar incolor. Manter a -20°C. Analisar num espaço de 3 dias.	Método Utilizado: HPLC-DAD Fase Móvel : (A) H ₂ O:MeOH (1%) (B) MeOH (C) <i>n</i> -hexano:ACN (10%) Fase Estacionária: Coluna RP C18, (250mm)	Mech-Nowak, 2012
Cereais	Luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, 13-cis luteína, 9-cis-luteína	200 mg de amostra + extração com 2 mL de água saturada de butanol. Vortex por 30s, agitação horizontal por 15 min. Repouso durante 60 min a 25 ° C. Homogeneização e agitação durante mais 15 min. Repouso por mais 60 min. 1,8 mL de extracto transferido para 2 mL de tubos castanhos de microcentrífuga e centrifugados a 4000 rpm e 20 ° C. Filtração do	Método Analítico: HPLC-DAD Fase móvel: (A) de MeOH / MTBE / água Milli Q (81: 15: 4, v / v / v) (B) de MTBE / MeOH (90:19, v / v) Eluição em gradiente Fase Estacionária: Coluna S3 (3 μ m, 4,6 x 100 mm)	Ndolo, 2013

		sobrenadante, armazenamento durante a noite a 20 ° C antes da análise.		
Couve e Espinafre	Luteína	500 mg de amostra em puré + 10 mL de MeOH durante 1 h num incubadora de agitação a 120 rpm. Homogeneização durante 30 s num banho de gelo + lavagem com MeOH. Centrifugação a 3000 rpm durante 5 min. Extracção repetida quatro vezes com THF+ Vortex + centrifugação. 1 mL do extrato evaporado sob azoto e reconstituição em 1 mL de EtOH.	Método utilizado: HPLC-APCI/MS Fase Móvel: (A) MeOH/TBME/Água (83:15:2, v/ v/v) (B) MeOH/TBME/Água (8:90:2, v/v/v) Fase Estacionária: Coluna C30 RP (150 x 3mm, 3 µm)	Lienau, 2003
Melância (20 genótipos)	Licopeno, luteína, violaxantina, neurosporeno, zeacaroteno, fitoflueno, fitoeno	3 g de amostra homogeneizada com 30 mL de acetona. Lavagem com acetona até ficar incolor+ <i>n</i> -hexano (50 mL) + 300 mL H ₂ O. Extratos de <i>n</i> -hexano evaporados sob azoto e reconstituídos com 0,5 mL de acetona.	Método Utilizado: HPLC-DAD Fase Móvel: (A) Acetato de etilo (B) ACN:H ₂ O (9:1, v/v) contendo 0,1% TEA Fase Estacionária: Coluna OSD2 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	Yoo, 2012
Pimentos vermelho e amarelo	20 carotenoides	15-20 g de amostra homogeneizada + acetona, transferido para éter de petróleo. Saponificação com sol. de KOH (10%), à temperatura ambiente, durante a noite. Extrato lavado e seco com sulfato de sódio. Evaporação sob azoto. Reconstituição em acetona	Método Utilizado: HPLC-DAD/MS Fase Móvel: ACN contendo 0,05% TEA:MeOH:Acetato de etilo, Eluição em gradiente Fase Estacionária: Coluna C18 (150 x 4,6 mm, 3 µm)	Azevedo-Meleiro, 2009

Produtos hortícolas (folhosos)	Luteína, α -caroteno, zeaxantina, β -criptoxantina, all- <i>trans</i> -caroteno, 13- <i>cis</i> -caroteno, 9- <i>cis</i> - β -caroteno	0,6 g de amostra aquecida a 85°C por 5 min em EtOH com BHT (0,1% w/v) + Saponificação com 400 μ L de KOH (20%). Vortex por 40 s + banho 85°C durante 10 min+ banho de gelo e 3 mL de H ₂ O desionizada. Após saponificação adição de Apo-8' carotenil decanoato. 4x extrações com <i>n</i> -hexano. Evaporação sob árgon+ reconstituição em 1 mL (50:50) MeOH:DCM	Método Analítico: HPLC-DAD Fase Móvel: (A) MeOH:H ₂ O (92:8, v/v) com 10 mmol/L acetato de amónio (B) MTBE Fase Estacionária: Coluna C30 (4,6mm x 250, 3 μ m)	Djuikwo, 2011
Batata-Doce	β -caroteno e isómeros	5 g de amostra+ extração com 3x50 mL de acetona fria. Filtração com 40 mL de éter de petróleo. Lavagem com 3x200 mL de água ultra-pura. Secagem da fase superior com sulfato de sódio anidro. Filtração e concentração até à secura em vácuo (30 ° C) e sob N ₂ . Reconstituição em 2 mL de acetona.	Método Utilizado: HPLC-DAD Fase Móvel: MeOH/MTBE (80:20), Eluição isocrática Fase estacionária: Coluna C30 (250 x 4,6 mm, 5 μ m)	Kidmose, 2007
Batata-Doce	β -caroteno	2 g de amostra + 5 mL de acetona + acetona / éter de petróleo (20:80)+ filtração. Procedimento repetido até incolor + secagem com sulfato de sódio anidro. Evaporação a vácuo máx. 35°C até aos 2 mL. Secagem sob azoto e reconstituição em 5 mL de éter de petróleo.	Método Utilizado: HPLC-UV/Vis Fase Móvel: ACN / MeOH / acetato de etilo / trietilamina (79: 10: 20: 0,05) Fase Estacionária: Coluna RP C18 (4.6 mm x 200 mm, 5 μ m)	Wu, 2008

Tomate (13 cultivares diferentes)	All- <i>trans</i> -carotenoides, isómeros <i>cis</i>	0,5 g de amostra de tomate seco em pó + 5 mL de acetona / etanol (1: 1, v / v). Agitação (150 rpm durante 1 h) + centrifugação. Extração até o resíduo ficar incolor. Sobrenadantes lavados com 10 mL do solvente de extração.	Método utilizado: UHPLC-DAD Fase móvel: (A) MeOH / MTBE / água (90: 5: 5, v / v) e (B) MeOH / MTBE / água Fase Estacionária: Coluna C18 (100mm x 2.1 mm, 1.7 µm) com coluna C18	Li et al., 2013
Tomate (20 cultivares e linhagens diferentes)	all- <i>trans</i> -luteína, Licopeno, β-caroteno, Isómeros <i>cis</i> de β-caroteno	0,5 g de amostra seca + 10 mL de EtOH: <i>n</i> -hexano (4:3, v/v)+ agitação (150 rpm durante 1h)+ centrifugação. Separação do sobrenadante+ 2 extrações com 10 mL de hexano. Sobrenadantes lavados com 50 mL de H ₂ O destilada + 50 mL de sol. aq. NaCl (10%). Evaporação sob azoto. Reconstituição em 1 mL com fase móvel.	Método Utilizado: UHPLC-DAD Fase móvel:(A) MeOH:MTBE:H ₂ O (90:5:5, v/v/v) (B) MeOH:MTBE:H ₂ O (90:5:5, v/v/v), Eluição de gradiente Fase Estacionária: C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm) com coluna C18	Li, 2012
Uvas	Isómeros de luteína, isómeros <i>cis</i> de luteína, Isómeros <i>cis</i> de β-caroteno	50 g de amostra + 25 µL BHA (12,66 mg/mL em EtOH). Homogeneização por 5 min com 3g de carbonato de magnésio. Adição de 100 µg de b-apo-8'-carotenal. Diluição com 40 mL de H ₂ O+ extração com 40 mL de <i>n</i> -hexano:éter dietílico (1:1, v/v). Evaporação. Resíduo dissolvido em 2 mL MTBE:hexano (1:1, v/v). -	Método Utilizado: HPLC-DAD-ESI/MS Fase Móvel: (A) TEA:H ₂ O (0,05%) (B) TEA:MeOH (0,05%) (C) TEA:MTBE (0,05%), Eluição em gradiente. Fase Estacionária: Coluna RP C30 (250 x 3mm, 5 µm) com coluna C30.	Crupi, 2010

Anexo 4

Folha de cálculo para a determinação do teor de carotenoides.

		Amostra Salada de frutas				Nº amostra 82.2				Nº/data requis.				0			
		Executante LNS				Pasta 0				Observações				0			
Data análise Início/Fim		25.05.2015															
		trans-luteína				trans-zeaxantina				trans-β-criptoxantina				dl-α-tocoferol			
Replicado		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Saponificação		não		sim		não		sim		não		sim		não		sim	
Recta Calibração Y(Área) vs X(µg/mL)	Declive	440702				512782				503344							
	Ordenada Origem	-12257				-1691				-10196							
	r²	0,9977				0,998132				0,9989							
	Resíduos < 10% (níveis 2 a 6)	sim				sim				sim							
	S _{y/x}	46671				37580				30698							
Toma (g)		20,087	20,087	20,087	20,087	20,087	20,087	20,087	20,087	20,087	20,087	20,087	20,087	20,087	20,087	20,087	20,087
Volume reconstituição (mL)		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Diluição		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Teor replicado (µg/mL)		0,55	0,5500	0,5014	0,5014	0,1211	0,1211	0,2971	0,2971	0,2855	0,2855	0,8761	0,8761		0,0000		0,0000
Teor replicado (mg/100 g)		0,0137	0,0137	0,0125	0,0125	0,0030	0,0030	0,0074	0,0074	0,0071	0,0071	0,0218	0,0218	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Desvio padrão relativo da repetibilidade (%)		0,0		0,0		0,0		0,0		0,0		0,0		#DIV/0!		#DIV/0!	
Teor médio amostra (mg/100 g)		0,0137		0,0125		0,0030		0,0074		0,0071		0,0218		0,0000		0,0000	
Recuperação (%)		92,70	92,70	61,30	61,30	92,70	92,70	61,30	61,30	92,70	92,70	61,30	61,30	92,70	92,70	61,30	61,30
Teor replicado após recup. (mg/100 g)		0,015	0,015	0,020	0,020	0,003	0,003	0,012	0,012	0,008	0,008	0,036	0,036	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Des. padrão rel. repetibilidade após recuperação (%)		0,0		0,0		0,0		0,0		0,0		0,0		#DIV/0!		#DIV/0!	
Teor médio amostra após recuperação (mg/100 g)		0,0148		0,0204		0,0033		0,0121		0,0077		0,0356		0,0000		0,0000	
Provitamina A em equivalentes retinol (µg/100 g)		0,00				0,00				2,96				0,00			
Teor amostra (mg/100 g)		0,0204				0,0121				0,0356				0,0000			
Teor amostra - resultado final (mg/100 g)																	
Resultado final (rúbrica e data)																	
Confirmação (rúbrica e data)										Validação (rúbrica e data)							

Anexo 5

Exemplo de um relatório de construção de uma reta de calibração no programa EMPOWER® para cada carotenoide.



Curva Calibração

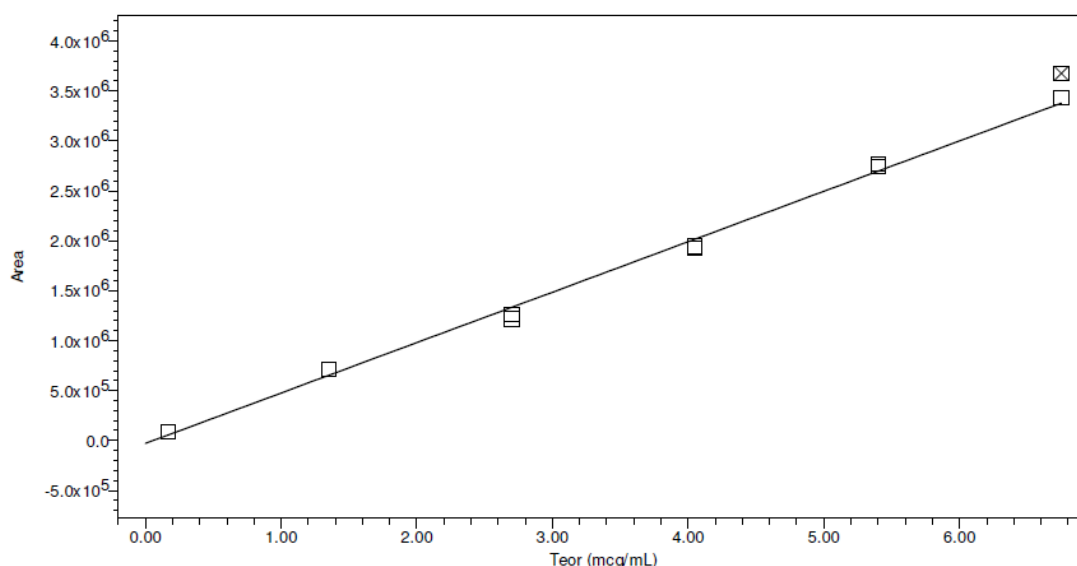
Reported by User: Graça Dias (Gdias)

Project Name: Referencia\Carotenoides_2014

Processing Method:	150612_CAR_150625_LNS	Project Name:	Referencia\Carotenoides_2014
Processing Method ID:	21856	System:	HPLC3
Calibration ID:	21869	Channel:	2998 Ch1 450nm@1.2nm
Date Calibrated:	6/25/2015 5:46:33 PM	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 450nm@1.2nm

Curva Calibração group for cis-licopeno contains no data.

Point Information ' Peak: cis-licopeno' table contains no data.



Name: luteína; A -28539.38; B 504554.81; Standard Error 74894.46; R: 0.997998; R²: 0.996000; Equation: Y = 5.05e+005 X - 2.85e+004; RT: 4.900; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve Id: 21870; Weighting: None

Peak: luteína

	Sample Name	Result Id	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	P1	21889	luteína		0.166	83586.752	0.222	-25.44	No	No
2	P1	21910	luteína		0.166	85770.532	0.227	-26.86	No	No
3	P2	21932	luteína		1.350	714752.029	1.473	-8.36	No	No
4	P2	21956	luteína		1.350	709941.703	1.464	-7.76	No	No
5	P3	21977	luteína		2.700	1263771.908	2.561	5.42	No	No
6	P3	21986	luteína		2.700	1216000.730	2.467	9.47	No	No
7	P4	21994	luteína		4.050	1942146.378	3.906	3.69	No	No

Report Method: Curva Calibração

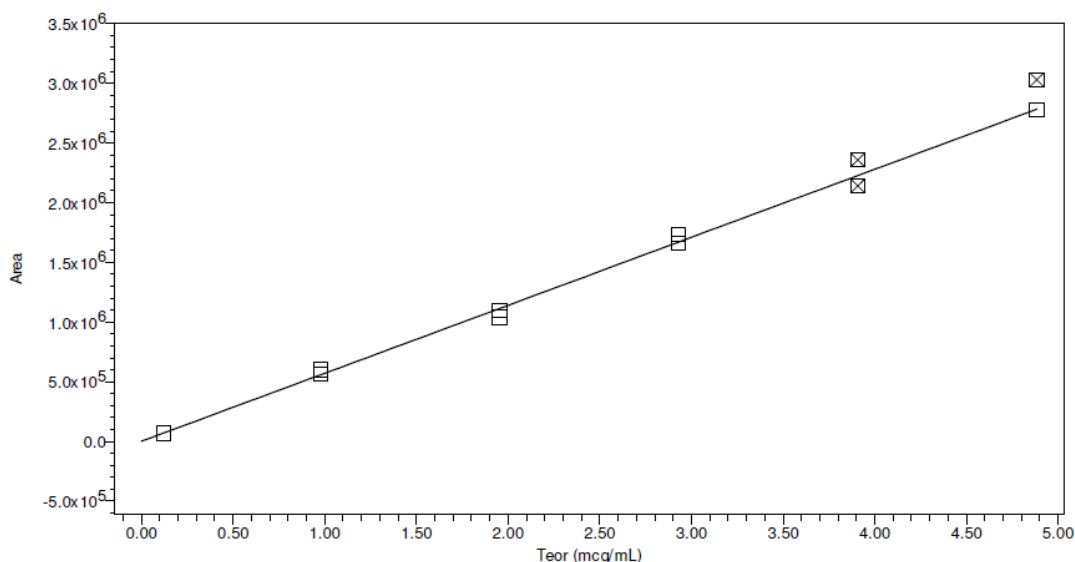
Printed 5:46:36 PM E 6/26/2015

Page: 1 of 8

Processing Method:	150612_CAR_150625_LNS	Project Name:	Referencia\Carotenoides_2014
Processing Method ID:	21856	System:	HPLC3
Calibration ID:	21869	Channel:	2998 Ch1 450nm@1.2nm
Date Calibrated:	6/25/2015 5:46:33 PM	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 450nm@1.2nm

Peak: luteína

	Sample Name	Result Id	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
8	P4	22004	luteína		4.050	1927695.490	3.877	4.46	No	No
9	P5	22014	luteína		5.400	2742171.395	5.491	-1.66	No	No
10	P5	22018	luteína		5.400	2766957.067	5.541	-2.53	No	No
11	P6	22036	luteína		6.750	3673395.091			No	Yes
12	P6	22053	luteína		6.750	3429610.886	6.854	-1.51	No	No



Name: zeaxantina; A 913.05; B 569750.72; Standard Error 40548.59; R: 0.999071; R²: 0.998142; Equation: Y = 5.70e+005 X + 9.13e+002; RT: 5.200; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve Id: 21871; Weighting: None

Peak: zeaxantina

	Sample Name	Result Id	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	P1	21889	zeaxantina		0.122	67421.828	0.117	4.43	No	No
2	P1	21910	zeaxantina		0.122	67345.998	0.117	4.55	No	No

Processing Method:	150612_CAR_150625_LNS	Project Name:	Referencia\Carotenoides_2014
Processing Method ID:	21856	System:	HPLC3
Calibration ID:	21869	Channel:	2998 Ch1 450nm@1.2nm
Date Calibrated:	6/25/2015 5:46:33 PM	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 450nm@1.2nm

Peak: zeaxantina

	Sample Name	Result Id	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
3	P2	21932	zeaxantina		0.977	599814.265	1.051	-7.08	No	No
4	P2	21956	zeaxantina		0.977	563301.741	0.987	-1.05	No	No
5	P3	21977	zeaxantina		1.953	1038733.954	1.822	7.24	No	No
6	P3	21986	zeaxantina		1.953	1100317.622	1.930	1.23	No	No
7	P4	21994	zeaxantina		2.930	1731227.905	3.037	-3.52	No	No
8	P4	22004	zeaxantina		2.930	1660325.134	2.913	0.60	No	No
9	P5	22014	zeaxantina		3.907	2357899.257			No	Yes
10	P5	22018	zeaxantina		3.907	2140626.525			No	Yes
11	P6	22036	zeaxantina		4.884	3030226.838			No	Yes
12	P6	22053	zeaxantina		4.884	2778718.121	4.875	0.16	No	No

Curva Calibração group for b-apo-8'-carotenal contains no data.

Point Information ' Peak: b-apo-8'-carotenal' table contains no data.

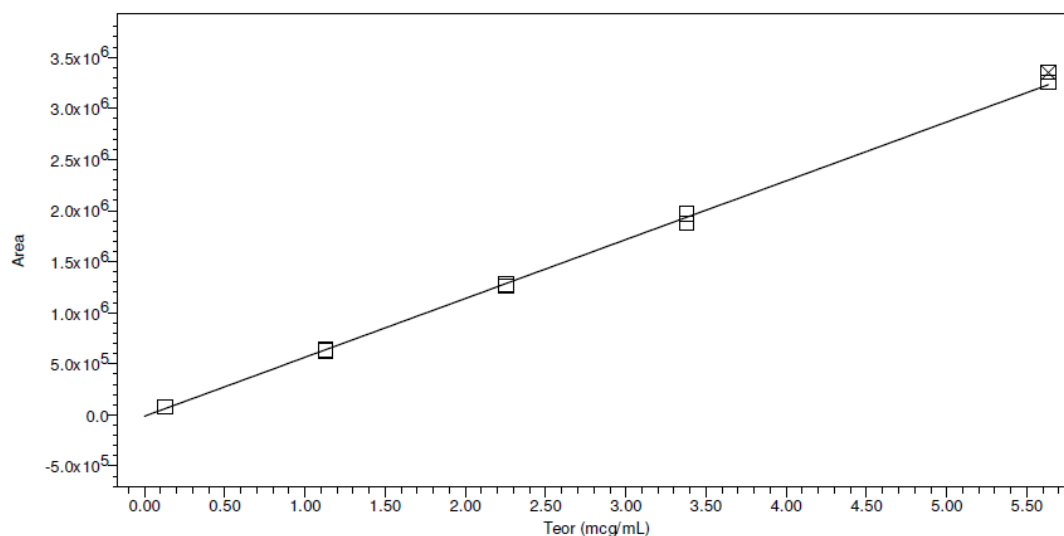
Reported by User: Graça Dias (Gdias)

Project Name: Referencia/Carotenoides_2014

Processing Method:	150612_CAR_150625_LNS	Project Name:	Referencia/Carotenoides_2014
Processing Method ID:	21856	System:	HPLC3
Calibration ID:	21869	Channel:	2998 Ch1 450nm@1.2nm
Date Calibrated:	6/25/2015 5:46:33 PM	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 450nm@1.2nm

Curva Calibração group for equinenona contains no data.

Point Information 'Peak: equinenona' table contains no data.



Name: b-criptoxantina; A -11853.54; B 575947.68; Standard Error 31420.99; R: 0.999591; R²: 0.999182;
Equation: $Y = 5.76e+005 X - 1.19e+004$; RT: 8.060; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve Id: 21874;
Weighting: None

Peak: b-criptoxantina

	Sample Name	Result Id	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	P1	21889	b-criptoxantina		0.128	81305.200	0.162	-20.62	No	No
2	P1	21910	b-criptoxantina		0.128	80486.020	0.160	-19.91	No	No
3	P2	21932	b-criptoxantina		1.127	639301.275	1.131	-0.33	No	No
4	P2	21956	b-criptoxantina		1.127	625999.327	1.107	1.74	No	No
5	P3	21977	b-criptoxantina		2.254	1280716.787	2.244	0.42	No	No
6	P3	21986	b-criptoxantina		2.254	1258380.608	2.205	2.18	No	No

Report Method: Curva Calibração

Printed 5:46:36 PM E 6/26/2015

Page: 4 of 8

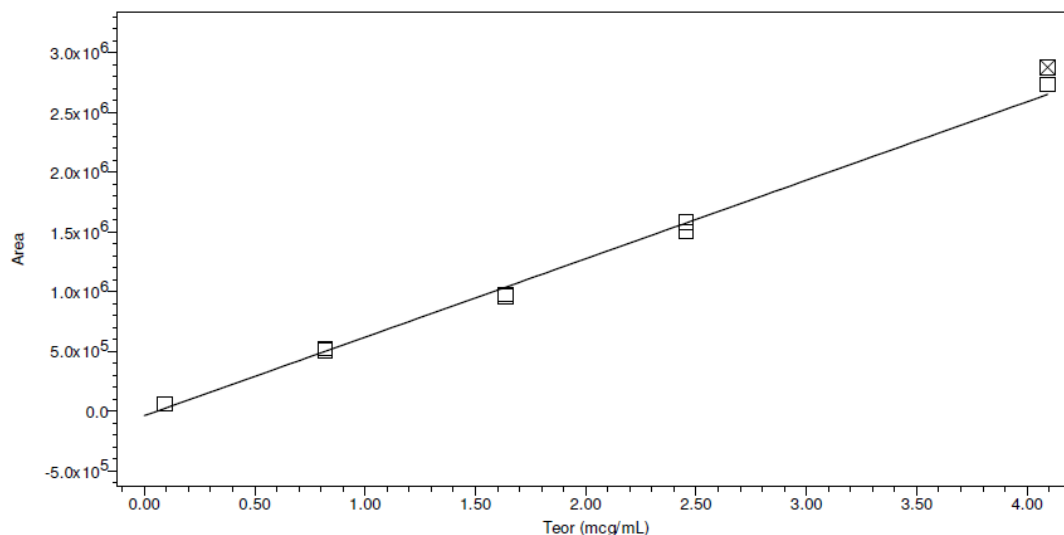
Processing Method:	150612_CAR_150625_LNS	Project Name:	Referencia\Carotenoides_2014
Processing Method ID:	21856	System:	HPLC3
Calibration ID:	21869	Channel:	2998 Ch1 450nm@1.2nm
Date Calibrated:	6/25/2015 5:46:33 PM	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 450nm@1.2nm

Peak: b-criptoxantina

	Sample Name	Result Id	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
7	P4	21994	b-criptoxantina		3.380	1968465.329	3.438	-1.69	No	No
8	P4	22004	b-criptoxantina		3.380	1877290.345	3.280	3.06	No	No
9	P6	22036	b-criptoxantina		5.634	3351670.789			No	Yes
10	P6	22053	b-criptoxantina		5.634	3261727.265	5.684	-0.88	No	No

Curva Calibração group for licopeno contains no data.

Point Information ' Peak: licopeno' table contains no data.



Name: a-caroteno; A -38498.37; B 657424.40; Standard Error 60883.08; R: 0.997775; R²: 0.995554;
Equation: $Y = 6.57e+005 X - 3.85e+004$; RT: 14.700; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve Id: 21877;
Weighting: None

Processing Method:	150612_CAR_150625_LNS	Project Name:	Referencia\Carotenoides_2014
Processing Method ID:	21856	System:	HPLC3
Calibration ID:	21869	Channel:	2998 Ch1 450nm@1.2nm
Date Calibrated:	6/25/2015 5:46:33 PM	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 450nm@1.2nm

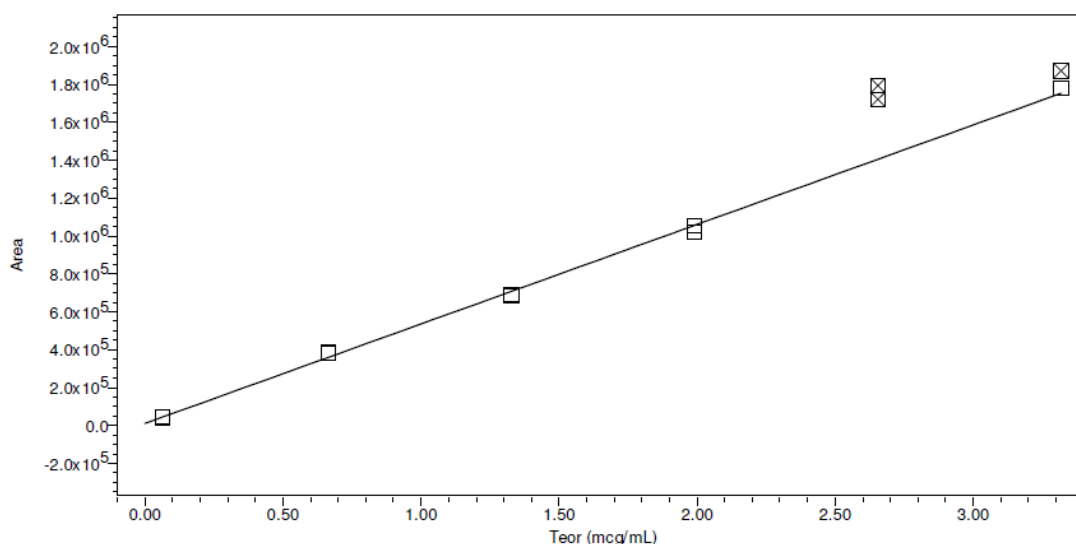
Peak: a-caroteno

	Sample Name	Result Id	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	P1	21889	a-caroteno		0.092	64111.280	0.156	-41.31	No	No
2	P1	21910	a-caroteno		0.092	63264.500	0.155	-40.82	No	No
3	P2	21932	a-caroteno		0.819	523035.824	0.854	-4.16	No	No
4	P2	21956	a-caroteno		0.819	508425.705	0.832	-1.60	No	No
5	P3	21977	a-caroteno		1.637	978749.817	1.547	5.80	No	No
6	P3	21986	a-caroteno		1.637	961551.722	1.521	7.62	No	No
7	P4	21994	a-caroteno		2.456	1581095.652	2.464	-0.32	No	No
8	P4	22004	a-caroteno		2.456	1504263.694	2.347	4.65	No	No
9	P6	22036	a-caroteno		4.093	2879002.027			No	Yes
10	P6	22053	a-caroteno		4.093	2737911.640	4.223	-3.09	No	No

Curva Calibração group for cis-a-caroteno contains no data.

Point Information ' Peak: cis-a-caroteno' table contains no data.

Processing Method: 150612_CAR_150625_LNS	Project Name: Referencia\Carotenoides_2014
Processing Method ID: 21856	System: HPLC3
Calibration ID: 21869	Channel: 2998 Ch1 450nm@1.2nm
Date Calibrated: 6/25/2015 5:46:33 PM	Proc. Chnl. Descr.: 2998 Ch1 450nm@1.2nm



Name: b-caroteno; A 10483.76; B 525163.33; Standard Error 24560.63; R: 0.999139; R²: 0.998280;
Equation: $Y = 5.25e+005 X + 1.05e+004$; RT: 16.100; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve Id: 21879;
Weighting: None

Peak: b-caroteno

	Sample Name	Result Id	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	P1	21889	b-caroteno		0.065	44438.402	0.065	0.07	No	No
2	P1	21910	b-caroteno		0.065	41608.043	0.059	9.17	No	No
3	P2	21932	b-caroteno		0.664	383934.800	0.711	-6.67	No	No
4	P2	21956	b-caroteno		0.664	385747.233	0.715	-7.12	No	No
5	P3	21977	b-caroteno		1.327	682495.292	1.280	3.73	No	No
6	P3	21986	b-caroteno		1.327	693436.845	1.300	2.07	No	No
7	P4	21994	b-caroteno		1.991	1054525.723	1.988	0.15	No	No
8	P4	22004	b-caroteno		1.991	1020433.161	1.923	3.54	No	No
9	P5	22014	b-caroteno		2.655	1794296.593			No	Yes



Curva Calibração

Reported by User: Graça Dias (Gdias)

Project Name: Referencia\Carotenoides_2014

Processing Method:	150612_CAR_150625_LNS	Project Name:	Referencia\Carotenoides_2014
Processing Method ID:	21856	System:	HPLC3
Calibration ID:	21869	Channel:	2998 Ch1 450nm@1.2nm
Date Calibrated:	6/25/2015 5:46:33 PM	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 450nm@1.2nm

Peak: b-caroteno

	Sample Name	Result Id	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
10	P5	22018	b-caroteno		2.655	1720981.860			No	Yes
11	P6	22036	b-caroteno		3.319	1872046.575			No	Yes
12	P6	22053	b-caroteno		3.319	1781055.895	3.371	-1.57	No	No

Curva Calibração group for cis-b-caroteno contains no data.

Point Information ' Peak: cis-b-caroteno' table contains no data.

Anexo 6

Tabela A.6- Parâmetros calculados para a representação das cartas de controlo de médias.

	Teor em mg/100 g					
Sub-amostras	α -caroteno	β -caroteno	licopeno	luteína	zeaxantina	β -criptoxantina
\bar{x}	0,220	0,690	1,860	0,051	0,041	0,120
s	0,042	0,067	0,547	0,010	0,003	0,013
$\bar{x} + s$	0,262	0,757	2,407	0,061	0,044	0,133
$\bar{x} + 2s$	0,305	0,823	2,953	0,071	0,047	0,146
$\bar{x} + 3s$	0,347	0,890	3,500	0,081	0,050	0,158
$\bar{x} - s$	0,178	0,623	1,313	0,041	0,038	0,107
$\bar{x} - 2s$	0,135	0,557	0,767	0,031	0,035	0,094
$\bar{x} - 3s$	0,093	0,490	0,220	0,021	0,032	0,082

Anexo 7

Tabela A.7- DMS nas amostras de frutos analisadas.

Amostra	Analito	Conc. Média (mg/100 g)	DMS (mg/100 g)
Salada de frutas	α -caroteno	0,0078	0,0024
	β -caroteno	0,048	0,014
	β -criptoxantina	0,026	0,0075
	Licopeno	0,080	0,022
	Luteína	0,029	0,011
	Zeaxantina	0,015	0,0061
Figos secos	β -caroteno	0,014	0,0041
	β -criptoxantina	0,0034	0,0010
	Licopeno	0,0087	0,0023
	Luteína	0,013	0,0049
	Zeaxantina	0,017	0,0067
Uvas	β -caroteno	0,025	0,0074
	Luteína	0,041	0,015
	Zeaxantina	0,0035	0,0014
Laranja	β -caroteno	0,030	0,0088
	β -criptoxantina	0,044	0,013
	Luteína	0,015	0,0054
	Zeaxantina	0,036	0,014
Maça	β -caroteno	0,016	0,0048
	β -criptoxantina	0,0044	0,0013
	Luteína	0,018	0,0065
	Zeaxantina	0,0038	0,0015
Pera	Luteína	0,011	0,0041
	Zeaxantina	0,0042	0,0017
Melo	β -caroteno	0,24	0,072
	Luteína	0,041	0,015
Melão	β -caroteno	0,029	0,0087
	Luteína	0,018	0,0066

Anexo 8

Tabela A.9 DMS nas amostras de produtos hortícolas analisadas.

Amostra	Analito	Conc. Média (mg/100 g)	DMS (mg/100 g)
Batata	Luteína	0,030	0,011
	Zeaxantina	0,016	0,0063
Brócolos	β -caroteno	0,46	0,14
	Luteína	1,1	0,39
Tomate	β -caroteno	0,31	0,094
	Licopeno	2,3	0,63
	Luteína	0,18	0,066
Alface	β -caroteno	0,83	0,25
	Luteína	1,0	0,38
Grelós	β -caroteno	3,3	1,0
	Luteína	6,2	2,3
Nabiças	β -caroteno	4,0	1,20
	Luteína	6,9	2,6
Cenouras	α -caroteno	4,2	1,3
	β -caroteno	8,6	2,58
	Luteína	0,65	0,24
Couve-flor	β -caroteno	0,0038	0,0011
	Luteína	0,020	0,0072
Pimentos	β -caroteno	0,87	0,26
	Luteína	0,34	0,13
	Zeaxantina	0,17	0,070
Feijão-Verde	α -caroteno	0,035	0,011
	β -caroteno	0,24	0,071
	Luteína	0,50	0,18

Anexo 9

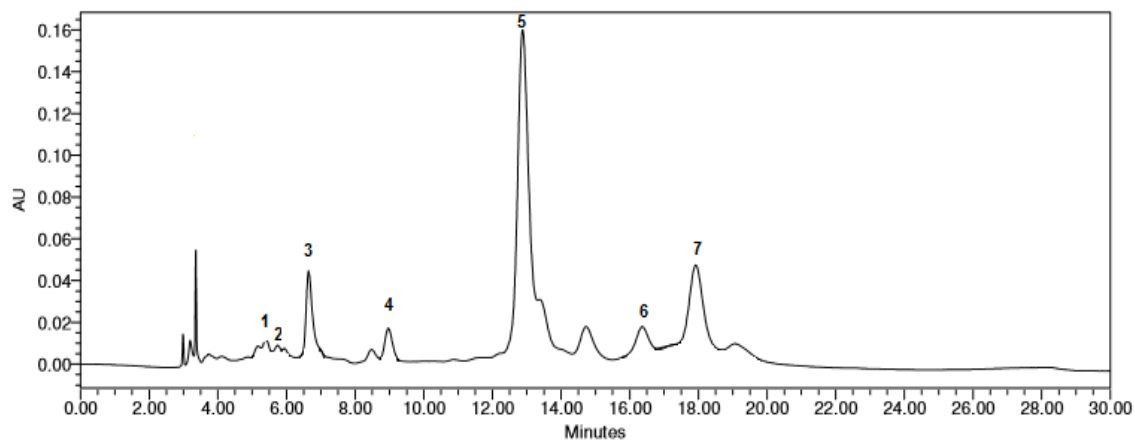


Figura A.9- Cromatograma do material de referência interno contendo 1 - luteína (tr=5,403 min), 2 - zeaxantina (tr=5,742 min), 3 – β -apo-8'-carotenal (tr=6,644), 4 - β -criptoxantina (tr=8,964 min), 5 - licopeno (tr=12,939 min), 6 – α -caroteno (tr=16,353 min) e 7- β -caroteno (tr=17,921 min).

Anexo 10

Comunicação oral para a 8ª Reunião Anual Portifir

Influência da sazonalidade no teor de carotenoides em frutos

Lucélia Silva^{a,b}, Celeste Serra^b, M. Graça Dias^a

^aDepartamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP, Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa

^bCentro de Investigação em Engenharia Química e Biotecnologia, Área Departamental de Engenharia Química, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, R. Conselheiro Emídio Navarro nº 1, 1959-007 Lisboa
email: m.graca.dias@insa.min-saude.pt



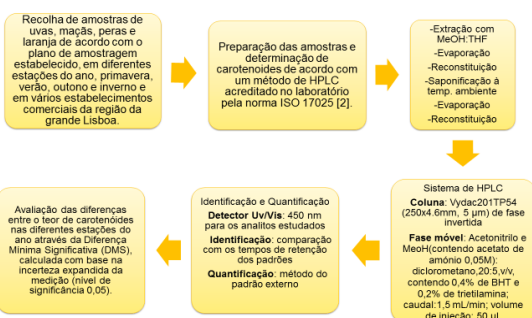
Introdução

Os carotenoides são compostos bioativos com efeitos positivos na saúde e alguns têm função nutriente provitamina A. A composição em carotenoides dos alimentos pode variar quantitativa e/ou qualitativamente. Para uma mesma espécie, estas variações ocorrem por diversos factores tais como: variedade, tipo de solo de cultivo, estado de maturação, clima, localização geográfica, estação do ano [1].

Objetivos

Este trabalho teve como objetivo avaliar o teor de carotenoides em vários frutos, disponíveis no mercado português, uvas, laranjas, peras e maçãs, em diferentes estações do ano.

Materiais e Métodos



Resultados e Discussão

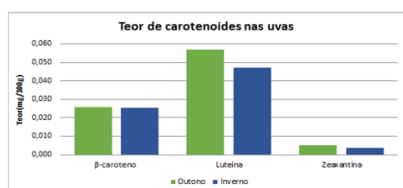


Figure 1 – Teor de carotenoides em amostras de uvas recolhidas no outono e no inverno.

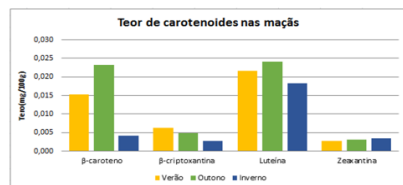


Figure 2 – Teor de carotenoides em amostras de maçãs recolhidas no verão, outono e no inverno.

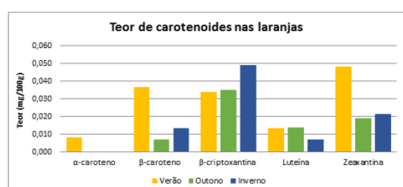


Figure 3 – Teor de carotenoides em amostras de laranjas recolhidas no verão, outono e no inverno.

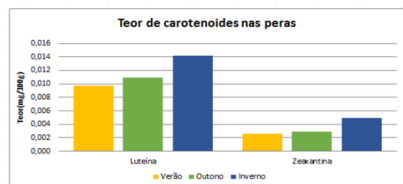


Figure 4 – Teor de carotenoides em amostras de peras recolhidas no verão, outono e no inverno.

- As diferenças entre os teores de carotenoides nas amostras foram avaliadas com base na Diferença Mínima Significativa (DMS), calculada a partir de incerteza expandida da medição para um nível de significância de 5% [3].
- Os teores de carotenoides, β-caroteno, luteína e zeaxantina nas amostras de **uvas** recolhidas na estação de outono e inverno, não apresentaram diferenças significativas.
- Nas amostras de **maçãs**, existe uma diferença significativa nos teores em β-caroteno e β-criptoxantina para as três estações; o mesmo não se verificou para o teor em luteína e zeaxantina que não diferiram significativamente nas três estações do ano.
- As amostras de **laranjas** recolhidas nas três estações do ano, apresentam diferenças significativas relativamente ao teor em β-caroteno, sendo o teor mais elevado no verão. Quanto à β-criptoxantina, as amostras recolhidas no verão e no outono não diferiram significativamente, mas a amostra recolhida no inverno apresentou um teor significativamente superior. Para a luteína o teor no inverno foi significativamente inferior ao do verão e outono. No que se refere à zeaxantina o teor no verão foi significativamente superior ao do outono e inverno.
- Para as **peras**, os teores de luteína não foram significativamente diferentes no verão, outono e inverno. Os teores de zeaxantina, estes não foram significativamente diferentes no verão e no outono mas os teores no inverno foram significativamente superiores aos do outono.

Conclusões

- Tendo em consideração que o plano de amostragem dos frutos foi estabelecido com base no consumo da população, os carotenoides ingeridos a partir de uma determinada espécie de fruta podem ser diferentes qualitativa e quantitativamente nas diferentes estações do ano.
- Para avaliar a ingestão de carotenoides a partir de frutos, pela população, nas diferentes estações do ano, este estudo deve ser complementado com a avaliação dos teores nestes frutos na primavera e combinados com a determinação de carotenoides em outros frutos que possam contribuir significativamente para a sua ingestão.

Referências

- [1] - Maiani G., Castón M., Catalá G., Toti E., Cambrón I., Bysted A. et al. (2009). Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Molecular Nutrition Food Research* p. 1-25.
- [2] - Dias M.G., Camões M.F.G.F.C., Oliveira L. (2008). Uncertainty estimation and inhouse method validation of HPLC analysis of carotenoids for food composition data production. *Food Chemistry* 109, p. 815-824.
- [3] - Dias M.G., Camões M.F.G.F.C., Oliveira L. (2009). Carotenoids in traditional Portuguese fruits and vegetable. *Food Chemistry* 113, p. 808-815.